

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

**INTERAÇÃO ENTRE *Acanthamoeba polyphaga* e *Streptomyces* sp. EM UM
MODELO DE COCULTIVO VISANDO A OBTENÇÃO DE EXTRATO BRUTO
COM AÇÃO ANTIMICROBIANA**

Dissertação de mestrado

KELI CRISTIANE CARVALHO BARROSO

Porto Alegre

Agosto/2015

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

**INTERAÇÃO ENTRE *Acanthamoeba polyphaga* e *Streptomyces* sp. EM UM
MODELO DE COCULTIVO VISANDO A OBTENÇÃO DE EXTRATO BRUTO
COM AÇÃO ANTIMICROBIANA**

KELI CRISTIANE CARVALHO BARROSO

Bacharel em Ciências Biológicas

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. Área de Concentração: Microbiologia Ambiental

Orientadora: Prof^a. Dr. Marilise Brittes Rott

Co-orientadora: Prof^a. Dr. Sueli Van Der Sand

Porto Alegre, Rio Grande do Sul - Brasil

Agosto/2015

CIP - Catalogação na Publicação

Carvalho Barroso, Keli Cristiane
INTERAÇÃO ENTRE Acanthamoeba polyphaga e
Streptomyces sp. EM UM MODELO DE COCULTIVO VISANDO A
OBTENÇÃO DE EXTRATO BRUTO COM AÇÃO ANTIMICROBIANA /
Keli Cristiane Carvalho Barroso. -- 2015.
74 f.

Orientadora: Marilise Brittes Rott.
Coorientadora: Sueli Van Der Sand.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. Acanthamoeba polyphaga. 2. Streptomyces sp..
3. Interação. 4. Cocultivo. 5. Extrato bruto. I.
Brittes Rott, Marilise, orient. II. Van Der Sand,
Sueli, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

AGRADECIMENTOS

Em breves palavras venho expressar aqui o meu agradecimento a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para minha ciência.

A Deus, o senhor todo poderoso, por sempre estar presente em meus pensamentos. Bem-aventurados aqueles que não viram, mas creram.

A ele, o cara que sempre esteve e está ao meu lado ao longo desta jornada, á você Vinícius José, o meu muito obrigado, pelo carinho, dedicação e por me aturar toda este tempo, obrigada por ser o grande inspirador para a evolução dos meus conhecimentos.

A minha família, pela compreensão. Mesmo distantes de mim, de alguma forma sempre me apoiaram e ajudaram a manter a calma nas horas de desesperança.

A minha orientadora Marilise Brittes Rott, o meu muito obrigado pela oportunidade, amizade, confiança que depositaste em mim e pelo conhecimento adquirido para meu crescimento profissional e pessoal.

A minha coorientadora Sueli T. Van Der Sand, pelo comprometimento, atenção em me auxiliar no desenvolvimento de meus conhecimentos, o meu muito obrigado.

Aos amigos, colegas, professores do pós que contribuíram para meu crescimento. Professores do laboratório de parasitologia que de alguma forma contribuíram para o meu desenvolver humano.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

E por fim, não menos importante, ao meu melhor amigo, meu cusco Juca Batista.

Muito obrigada a todos.

**INTERAÇÃO ENTRE *Acanthamoeba polyphaga* e *Streptomyces* sp. EM UM
MODELO DE COCULTIVO VISANDO A OBTENÇÃO DE EXTRATO BRUTO COM
AÇÃO ANTIMICROBIANA¹**

Autor: Keli Cristiane Carvalho Barroso

Orientadora: Prof^a. Dr. Marilise Brittes Rott

Co-orientadora: Prof^a. Dr. Sueli Van Der Sand

RESUMO

As interações que ocorrem entre as bactérias e amebas podem dar-se através de relações mútuas, onde ambos os organismos se beneficiam da associação ou parasitárias em que um organismo se beneficia em detrimento do outro. A convivência de vários microrganismos que compartilham o mesmo ambiente pode produzir alterações seja no crescimento dos organismos, nos padrões de adaptação, na morfologia, no seu desenvolvimento, ou até mesmo na sua capacidade para sintetizar proteínas e metabólitos secundários. Neste estudo, é avaliada a interação entre *Acanthamoeba polyphaga* e *Streptomyces* sp. através de cocultivo, com objetivo de obter extratos brutos com ação antimicrobiana. No cocultivo, as amebas inviabilizaram na presença da bactéria. Após contato com as amebas houve alteração morfológica em *Streptomyces* sp. em todos os tempos de incubação, com produção de hifas, diferente do controle que permaneceu na fase de esporos. A partir do cocultivo foi possível obter extrato bruto em 50 dias, sendo avaliados em diferentes tempos de incubação (1^o, 7^o, 14^o, 21^o e 28^o dias), contra bactérias multirresistentes como *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, mostrando atividade antimicrobiana, tanto no cocultivo quanto no controle. Com análise estatística foi possível verificar que os extratos produzidos em 24 horas (1^o) apresentaram maior atividade, especialmente contra *P. aeruginosa*. Os extratos produzidos pelo cocultivo e controle se comportaram diferentemente um do outro, porém as diferenças não foram estatisticamente significativas. Em relação à biomassa produzida, foi observado maior volume de biomassa no cocultivo, do que no controle, indicando que o contato entre os dois microrganismos favoreceu a produção de massa celular, porém não houve diferença significativa, somente quando comparado entre dias. Estes resultados mostram que há interação entre *Acanthamoeba* e *Streptomyces* uma vez que, a bactéria se beneficiou da ameba auxiliando no seu desenvolvimento. Esta interação entre os microrganismos pode ser importante na modulação da produção de substâncias de ação antimicrobiana, fato que ainda necessita investigação.

¹ Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (73p.) Agosto, 2015

**INTERACTION BETWEEN *Acanthamoeba polyphaga* and *Streptomyces* sp. IN A
COCULTIVATION TARGETING MODEL SEARCHING FOR AN EXTRACT WITH
ANTIMICROBIAL ACTIVITY²**

Author: Keli Cristiane Carvalho Barroso

Professor: Prof^a. Dr. Marilise Brittes Rott

Co-orientadora: Prof^a. Dr. Sueli Van Der Sand

ABSTRACT

The interactions that occur between bacteria and amoebas can give through mutual relations, where both organisms benefit from the association or parasitic in which one organism benefits at the expense of the other. The coexistence of various microorganisms share the same environment can produce alterations in the growth of the organisms is, patterns of adaptation in morphology, development, or even in their ability to synthesize proteins and secondary metabolites. This study evaluates the interaction between *Acanthamoeba polyphaga* and *Streptomyces* sp. through cocultivation, in order to obtain crude extracts with antimicrobial action. In cocultivation, amoebas made it impossible in the presence of the bacteria. After contact with amoebae were morphological changes in *Streptomyces* sp. All incubation times with hyphae production, different control spores this remained in phase. From the cocultivation it was possible to obtain crude extract in 50 days, being evaluated in different incubation times (1^o, 7^o, 14^o, 21^o and 28^o days), against multiresistant bacteria such as *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, showing antimicrobial activity in both the cocultivation and in control. With statistical analysis found that the extracts in 24 hours (1^o) showed greater activity, especially against *P. aeruginosa*. The extracts produced by the coculture and control behaved differently from one another, but the differences were not statistically significant. Regarding the biomass produced, there was a higher volume of biomass in cocultivation, than in the control, indicating that the contact between the two organisms favored the cell mass production, but there was no significant difference only when compared between days. These results show that there is interaction between *Acanthamoeba* and *Streptomyces* since the bacteria benefited amoeba assisting in their development. This interaction between microorganisms may be important in modulating the production of antimicrobial substances, a fact that still requires investigation.

² Master of Science dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology, Institute of basic health sciences, federal university of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (73p.) August, 2015

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo Geral	3
2.2 Objetivos específicos	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 <i>Acanthamoeba</i> spp.	4
3.2 Infecções causadas por <i>Acanthamoeba</i> spp.	6
3.3 Interação entre <i>Acanthamoeba</i> e bactérias	6
3.4 Actinomicetos	8
3.5 <i>Streptomyces</i> sp.	10
3.6 Metabólitos secundários	12
3.7 <i>Escherichia coli</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14
4 MATERIAIS E MÉTODOS	16
4.1 Condições de crescimento de <i>Acanthamoeba polyphaga</i>	16
4.2 Condições de crescimento de <i>Streptomyces</i> sp.	16
4.3 Condições de crescimento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Escherichia coli</i>	16
Antimicrobianos	17
<i>Escherichia coli</i>	17
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17
4.4 Cocultivo entre <i>Acanthamoeba polyphaga</i> e <i>Streptomyces</i> sp.	18
4.5 Viabilidade amebiana após cocultivo	19
4.6 Viabilidade bacteriana após cocultivo	20
4.7 Avaliação da atividade antimicrobiana através da técnica de dupla camada	20
4.8 Produção de extrato bruto do cocultivo	21
4.9 Testes de antibiose por difusão em poço	22
4.10 Avaliação da produção de biomassa (peso seco)	24
4.11 Avaliação da atividade do sobrenadante do cocultivo contra <i>E. coli</i> e <i>P. aeruginosa</i>	25
4.12 Avaliação da atividade do lisado do cocultivo contra <i>Escherichia coli</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25
4.13 Teste do sobrenadante semeado do cocultivo contra <i>E.coli</i> e <i>P. aeruginosa</i> ...	25

4.14 Avaliação da atividade do extrato bruto do cocultivo contra trofozoítos e cistos de <i>A. polyphaga</i>	26
4.15 Análise estatística	27
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	28
5.1 Viabilidade amebiana após cocultivo	28
5.2 Viabilidade bacteriana após cocultivo	31
5.3 Avaliação da atividade antimicrobiana do cocultivo pelo teste de dupla camada	31
5.4 Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato bruto do cocultivo pela difusão em poço	33
5.5 Avaliação da produção de biomassa (peso seco)	43
5.6 Avaliações do sobrenadante, do sobrenadante lisado e do sobrenadante semeado produzidos a partir do cocultivo, contra <i>E. coli</i> e <i>P. aeruginosa</i>	45
5.7 Avaliação de extratos brutos com maior atividade antimicrobiana, contra cistos e trofozoítos de <i>A. polyphaga</i>	45
6 CONCLUSÕES	46
PERSPECTIVAS	48
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
ANEXOS	60
ANEXO A: Preparo de meios de cultivo e soluções utilizadas	60

RELAÇÃO DE FIGURAS

Figura 1: Morfologia de <i>Acanthamoeba polyphaga</i> em condições que se encontram no ambiente.....	5
Figura 2: Divisão celular de <i>Acanthamoeba polyphaga</i>	5
Figura 3: Interação de bactérias com <i>Acanthamoeba</i>	7
Figura 4: Antibióticos produzidos por <i>Streptomyces</i> com suas respectivas datas de descoberta.....	11
Figura 5: Ciclo do <i>Streptomyces</i> sp.....	12
Figura 6: Modelo de cocultivo com seus respectivos tempos de incubação.	19
Figura 7: Processo para produção de extrato bruto do controle e cocultivo.....	22
Figura 8: Processo do teste de difusão em poço dos extratos brutos do cocultivo e controle (<i>Streptomyces</i> sp) contra <i>E. coli</i> e <i>P. aeruginosa</i>	23
Figura 9: Procedimento de separação de extrato bruto e massa celular. Processo de produção do extrato bruto em agitação (1). Extrato bruto centrifugado a 5000RPM/10 minutos (2). Separação da massa celular para realização do peso seco. (3)	24
Figura 10: Avaliação da atividade dos extratos brutos produzidos no 3º dia do tempo de incubação de 24horas e 504horas do controle e cocultivo.....	27
Figura 11: Viabilidade de <i>A. polyphaga</i> em cocultivo com <i>Streptomyces</i> sp. ao longo do tempo.	28
Figura 12: Cocultivo no tempo de incubação de 21 dias.....	30
Figura 13: Controle dos <i>Streptomyces</i> sp	30
Figura 14: Teste de dupla camada pelo método de picada.....	33
Figura 15: Teste de difusão em poço.	34
Figura 16: Avaliação da atividade antimicrobiana ao longo de 10 dias, após 24horas (1º dia) de incubação do cocultivo e controle, testados contra <i>E. coli</i> e <i>P. aeruginosa</i>	36
Figura 17: Avaliação da atividade antimicrobiana em 10 dias, após 168horas (7º) tempo de incubação do cocultivo e controle, testados contra <i>E. coli</i> e <i>P. aeruginosa</i>	37
Figura 18: Avaliação da atividade antimicrobiana em 10 dias, após 336horas (14º) tempo de incubação do cocultivo e controle, testados contra <i>E. coli</i> e <i>P. aeruginosa</i>	37
Figura 19: Avaliação da atividade antimicrobiana em 10 dias, após 504horas (21º)	

tempo de incubação do cocultivo e controle, testados contra <i>E. coli</i> e <i>P. aeruginosa</i>	38
Figura 20: Avaliação da atividade antimicrobiana em 10 dias, após 672 horas (28°) do tempo de incubação do cocultivo e controle, testados contra <i>E. coli</i> e <i>P. aeruginosa</i>	39
Figura 21: Produção de biomassa do controle e do cocultivo em diferentes tempos de incubação.	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Perfil de suscetibilidade dos isolado Gram negativos aos antimicrobianos	17
Tabela 2 - Testes univariados de importância para halos parametrização Sigma-restrito - Hipótese de Decomposição Eficaz.....	40

1 INTRODUÇÃO

Protozoários do gênero *Acanthamoeba* são microrganismos oportunistas ou patogênicos, amplamente distribuídos no ambiente tendo sido isolados do solo, águas, ambiente hospitalar, plantas, estojos de lentes de contato entre outros (Reyes-Batlle et al, 2014; Caumo et al., 2009; Maschio et al., 2014; Carlesso et al., 2010, Landell et al, 2013; Pens et al, 2008).

Este protista possui característica anfizóica, ou seja, com capacidade de sobreviver livre no ambiente como também de ser patógeno para humanos e animais, ocupando hoje um nicho próprio no campo da parasitologia médica (Marciano Cabral & Cabral 2003; Siddiqui & Khan, 2012).

A importância deste microrganismo como agente etiológico de doenças é ressaltada pelo aumento de casos descritos, sendo *Acanthamoeba* agente causal de ceratite amebiana, encefalite amebiana granulomatosa, sinusites e infecções cutâneas. (Khan, 2006; Perez & Bush, 2007; Acharya et al, 2007; Jones et al, 1975; Booton et al, 2005).

Este protozoário é considerado um importante predador de bactérias, atuando no controle de populações microbianas no solo e em ambientes aquáticos. (Rodriguez-Zaragoza, 1994).

Interações entre o gênero *Acanthamoeba* e bactérias podem resultar em um estado endossimbiótico ou ainda levar à destruição de um dos associados ou ambos. (Greub & Raoult, 2004). Essas associações permitem que as amebas selecionem fatores de virulência e sobrevivam em condições adversas, exercendo pressão seletiva sobre organismos no ambiente. (Steenbergen et al,

2004).

Bactérias do gênero *Streptomyces* sp., também são amplamente distribuídas no solo e tem como característica a capacidade de serem utilizadas no controle biológico de fitopatógenos, sendo responsáveis pela degradação e reciclagem de substratos naturais, além de serem reconhecidas como produtores de inúmeros metabólitos secundários, com ação bactericida, fungicida, anti-helmínticos, inseticida e imunossupressores (Araújo, 1998; Kurylowicz 1981; Kurylowicz, et al, 1979).

Devido à onipresença destes microrganismos no ambiente e levando em consideração as características de ambos, o presente trabalho teve como alvo investigar a interação entre cepas ambientais de *Acanthamoeba polyphaga* e *Streptomyces* sp., avaliando o papel de *Acanthamoeba* como um estimulador da produção de compostos bioativos por bactérias do gênero *Streptomyces* sp. na busca por extratos brutos com ação antimicrobiana.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Verificar a interação entre *Acanthamoeba polyphaga* e *Streptomyces* sp. em um modelo de cocultivo visando a obtenção de um extrato bruto com ação antimicrobiana.

2.2 Objetivos específicos

Analisar a viabilidade celular dos trofozoítos de *Acanthamoeba polyphaga* após cocultivo com *Streptomyces* sp.

Analisar a viabilidade celular dos esporos de *Streptomyces* sp após cocultivo com *Acanthamoeba polyphaga*.

Produzir extrato bruto do cocultivo e controle e testar ação antimicrobiana contra as bactérias Gram negativas *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* após o cocultivo.

Verificar se há diferença nas biomassas produzidas pelos extratos brutos do cocultivo e controle.

Testar a atividade antimicrobiana do sobrenadante, sobrenadante lisado e semeado do sobrenadante do cocultivo, contra *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Verificar se os extratos brutos tiveram ação contra cistos e trofozoítos de *Acanthamoeba polyphaga*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *Acanthamoeba* spp.

Acanthamoeba é o gênero de protozoário pertencente ao filo Sarcomastigophora e sub-filo Sarcodina e que compõe o grupo de amebas de vida (AVL) livre potencialmente patogênicas juntamente com *Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris* e *Sappinia pedata* (Marciano-Cabral & Cabral, 2003).

Este protista é cosmopolita e mostra uma distribuição ubiquitária, já tendo sido isolado da terra, água e ar. (Rodríguez-Zaragoza 1994; Geisen et al, 2014). Frequentemente as AVL são isoladas de ecossistemas antropogênicos como a água da torneira, unidades de ar condicionado e torres de resfriamento. (Molmeret et al., 2005).

Acanthamoeba spp. apresentam duas formas morfológicas no seu desenvolvimento (Figura 1), sendo a forma trofozoítica metabolicamente ativa, observada em condições favoráveis, apresentando dimensões entre 12 e 35 μm de diâmetro e que se reproduz por fissão binária (Khan, 2006; Visvesvara et al., 2007). Em condições desfavoráveis como deficiência nutricional, dessecação, alterações no pH e temperatura, as amebas são capazes de formar cistos, com dimensões entre 9 e 12 μm , sendo essas estruturas resistentes a detergentes, cloro e antimicrobianos (De Jonckheere & Van de Voorde, 1976; Tuner et al., 2000; Marciano-Cabral e Cabral, 2003; Rodriguez-Zaragoza, 1994).

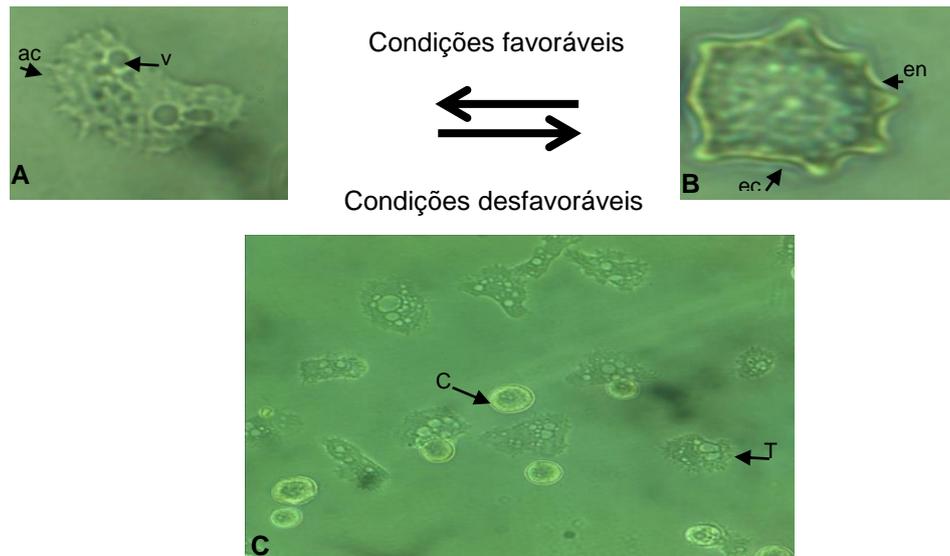


Figura 1: Morfologia de *Acanthamoeba polyphaga* em condições que se encontram no ambiente. (A) Trofozoíto com acanthapódios (ac), e vacúolos(v). (B) Cisto em forma estrelada com parede cística interna endocisto (en) e outra camada externa ectocisto (ec). Microscopia óptica 40x. (C) Cultivo de *Acanthamoeba polyphaga* apresentando as duas formas morfológicas cisto (c) e trofozoíto (T). Microscopia óptica 20x.

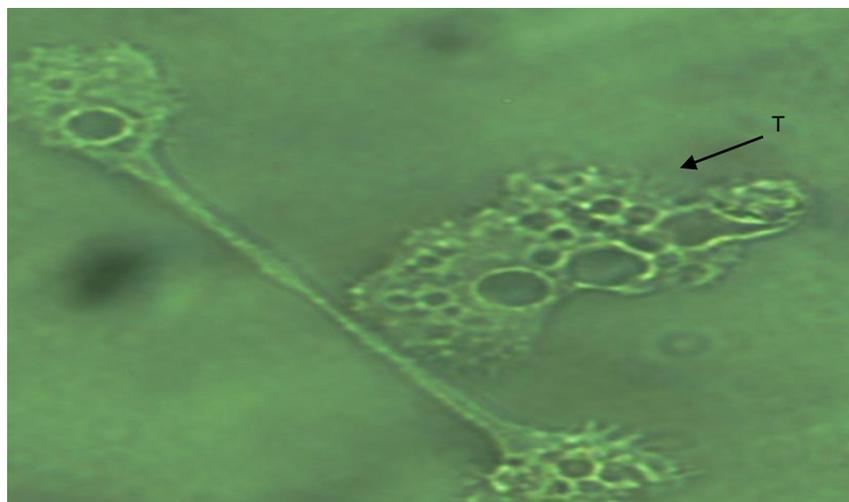


Figura 2: Divisão celular de *Acanthamoeba polyphaga* por fissão binária, ao lado um (T) trofozoíto. Microscopia óptica 40x.

3.2 Infecções causadas por *Acanthamoeba* spp.

Acanthamoeba spp. podem causar um amplo espectro de infecções que irão depender do contato da ameba com o hospedeiro assim como do status imunológico do mesmo. As mais importantes infecções causadas por *Acanthamoeba* são a Encefalite Amebiana Granulomatosa (EAG) e a ceratite amebiana.

EAG e outras enfermidades sistêmicas causadas por *Acanthamoeba*, geralmente estão associadas a indivíduos debilitados por fatores como infecção por HIV, tratamento imunossupressor após transplante de órgãos, alcoolismo, abuso de drogas, tratamento com esteróides, quimioterapia e radioterapia para câncer e os portadores de outras doenças como diabetes, lupus eritematoso sistêmico, insuficiência renal, cirrose, tuberculose, úlcera na pele e doença de Hodgkin (Visvesvara et al., 2007; Da Rocha-Azevedo et al., 2009; Chomicz et al., 2010).

Já a ceratite por *Acanthamoeba*, é uma doença aguda dolorosa e progressiva que afeta a córnea (Ertabaklar et al., 2009; Sarparanta et al., 2009) e acomete indivíduos hígidos, e que não desenvolvem imunidade protetora à reinfecção (Niederhorn et al., 1999). O uso inadequado de lentes de contato é o principal fator de risco à infecção ocular causada por *Acanthamoeba*, uma vez que as lentes podem atuar como veículos carreadores do patógeno (Awwad et al., 2007). Trauma de córnea por agentes físicos tendem a facilitar o processo infeccioso (Jones et al., 1975; Wang et al., 2014).

3.3 Interação entre *Acanthamoeba* e bactérias

As interações entre bactérias e amebas podem ocorrer através de relações mútuas, em que ambos os organismos se beneficiam da associação, ou

uma relação parasitária, em que um organismo se beneficia em detrimento do outro (Khan & Siddiqui 2014).

Quando se trata de sobrevivência de uma dada espécie, os organismos podem interagir de forma antagônica competindo pelo alimento, ou podem cooperar para obter requisitos nutricionais e evitar a predação por outros organismos. Podendo haver uma relação de "presa-predador" (Rønn et al., 2002).

Amebas de vida livre desempenham um papel versátil no ambiente, influenciando na regulação de populações microbianas (Khan & Siddiqui 2013). Além de utilizar as bactérias como fonte de alimento, (figura 3) *Acanthamoeba* também atua como um vetor/reservatório de patógenos bacterianos (Siddiqui & Khan 2012). Entretanto, algumas bactérias desenvolveram a capacidade de resistir à digestão pós-fagocitose amebiana, sendo denominadas bactérias resistentes à ameba (Greub & Raoult, 2004).

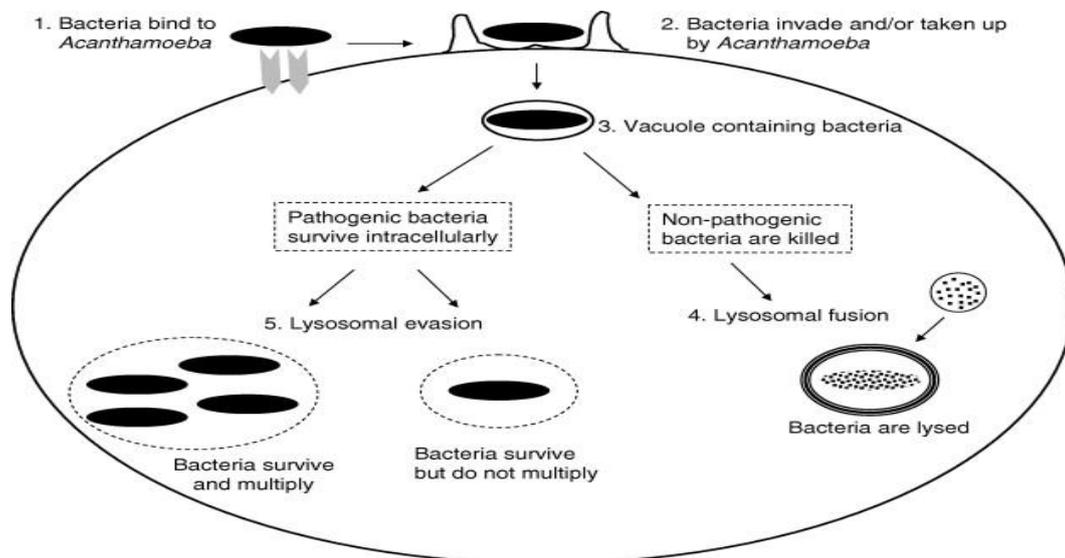


Figura 3: Invasão de bactérias em *Acanthamoeba*, uma vez intracelular, as bactérias não patogênicas são mortas e usadas como fonte de alimento, enquanto que as bactérias patogênicas evadem o mecanismo intracelular e sobrevivem ou multiplicam-se dentro de *Acanthamoeba*. Fonte: Siddiqui & Khan 2012.

As associações entre microrganismos e *Acanthamoeba* têm sido relatadas em diferentes espécies bacterianas, como por exemplo, *Legionella pneumophila*, um patógeno intracelular de seres humanos que é capaz de multiplicar-se no seu interior e utiliza as amebas como um veículo (Molmeret et al., 2005; Kwaik 1996).

Já *Mycobacterium smegmatis* apresentou capacidade de internalizar-se e multiplicar-se em *Acanthamoeba polyphaga*, escapando da via de degradação no interior do citoplasma, e ocasionou a lise amebiana (Lamrabet et al., 2012).

Portanto, *Acanthamoeba* e outras Amebas e vida livre, não só podem ser usadas para descobrir novas bactérias intracelulares, mas também como uma ferramenta para investigar a sua patogenicidade, descobrir novos fatores de virulência e estudar as interações patógeno/hospedeiro. (Tosetti et al., 2014).

3.4 Actinomicetos

Os actinomicetos ou actinobactérias são bactérias Gram-positivas, filamentosas, com alto teor de G+C (guanina + citosina) em seu DNA. Este filo está amplamente distribuído em diversos ambientes, como água, associado com líquens e principalmente em plantas e solo (González, 2005).

Podem ser aeróbios, microaerófilos ou anaeróbios (Lacaz et al., 2002). As actinobactérias possuem aspectos morfológicos e de ciclo celular diferenciados dos demais organismos Gram-positivos. Conforme o gênero podem ser esféricas, ou bacilares e formam, em algum estágio de seu desenvolvimento, hifas que compõem um micélio de coloração variada (Leblond & Decaris, 1994).

As colônias de actinomicetos são formadas por uma massa celular de

hifas, constituindo o micélio. Essa massa é formada a partir do desenvolvimento de esporos, esporângios ou fragmentos de hifas em meio sólido, constituindo primeiramente o micélio vegetativo, de caráter hidrofílico. Crescendo verticalmente, algumas cepas de actinomicetos diferenciam seu micélio vegetativo em micélio aéreo, de caráter hidrofóbico, o que provoca uma alteração nas características morfológicas, fisiológicas e ultraestruturais (Vobis, 1997). Diferem-se também de outras bactérias por possuírem um crescimento lento (Araújo, 1998).

Também, exibem propriedades metabólicas, tais como a produção de enzimas extracelulares e a formação de uma ampla variedade de metabólitos secundários. A maioria dos antibióticos em uso hoje são derivados de produtos naturais de actinobactérias, fungos e outras bactérias (Raju et al., 2010).

Os procariotos são os grandes responsáveis pela produção de compostos, atingindo um total de cerca de 50000 compostos. Destes, 22000 são bioativos e cerca de 16500 apresentam atividade antibiótica. Entre os procariotos, as bactérias pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Mixobacterias* e cianobactérias são responsáveis pela produção de 17% (3800) do total de compostos bioativos microbianos, actinomicetales representam 45% (10000), e fungos representam 38% da produção. Entre os actinomicetos, o gênero *Streptomyces* é o maior produtor com cerca de 70-80% dos metabólitos secundários bioativos, sendo os restantes produzidos por diferentes gêneros como *Saccharopolispora*, *Amycolatopsis*, *Micromonospora*, *Actinomadura*, *Nocardia*, *Microbispora*, *Streptosparangium* e *Actinoplanes*. (Demain, 1998; Challis & Hopwood, 2003; Berdy, 2005; El-Tarabity & Sivasithamparam, 2006).

Muitos dos metabólitos que são produzidos pelos actinomicetos apresentam ação sinérgica, como observado em *Streptomyces clavuligerus*,

Streptomyces jumonziensis e *Streptomyces katsurahamanus* com a coprodução de beta-lactâmicos (cefamicina) e ácido clavulânico e as estreptograminas (Challis & Hopwood, 2003).

3.5 *Streptomyces* sp.

Streptomyces são bactérias do solo, Gram positivas, aeróbias estritas, cujas colônias são pequenas pulverulentas ou aveludadas, com micélio aéreo de diferentes tonalidades e produtoras de pigmentos solúveis (Araújo, 1998).

O ciclo de vida é complexo, se inicia com a germinação do esporo, dando origem a um micélio formado por hifas ramificadas que penetram no substrato, metabolizando fontes orgânicas de nutrientes como polissacarídeos pela ação de enzimas extracelulares. (Figura 5). A partir deste micélio vegetativo (hifas primárias), desenvolve-se o micélio aéreo (hifas aéreas) no centro da colônia. As hifas são multicelulares, que darão origem a cadeias de esporos. Nesta fase, ativam-se os metabolismos secundários, em que são produzidos, principalmente, antibióticos e pigmentos (Araújo, 1998; Padilha, 1998).

Outra característica importante é que estruturas como esporos de *Streptomyces* não são resistentes ao calor, são metabolicamente menos ativos do que as células vegetativas, mas possuem algumas enzimas e metabolizam substratos endógenos e exógenos. Os esporos de *Streptomyces streptomycini*, por exemplo, contêm várias enzimas envolvidas no metabolismo central do carbono, nitrogênio e compostos contendo fósforo. As atividades específicas de algumas enzimas catalizando reações de desidrogenação, são maiores em esporos do que no micélio vegetativo jovem (Ensign, 1978).

Os esporos contribuem para a preservação da espécie, pois mesmo não resistindo ao calor, resistem à dessecação, ajudando as espécies a sobreviverem no período da estiagem (Ventura et al., 2007).

Streptomyces sp. são conhecidos mundialmente devido a sua enorme capacidade de produzir metabólitos secundários, fornecendo ao mercado farmacêutico as mais variadas opções terapêuticas (Padilha 1998; Taechowisan et al., 2003). Além dos antibióticos (figura 4) de uso clínico, para humanos, veterinário e agroquímico, outros metabólitos secundários são produzidos como, enzimas, imunomoduladores e inibidores de enzimas (Araújo, 1998).

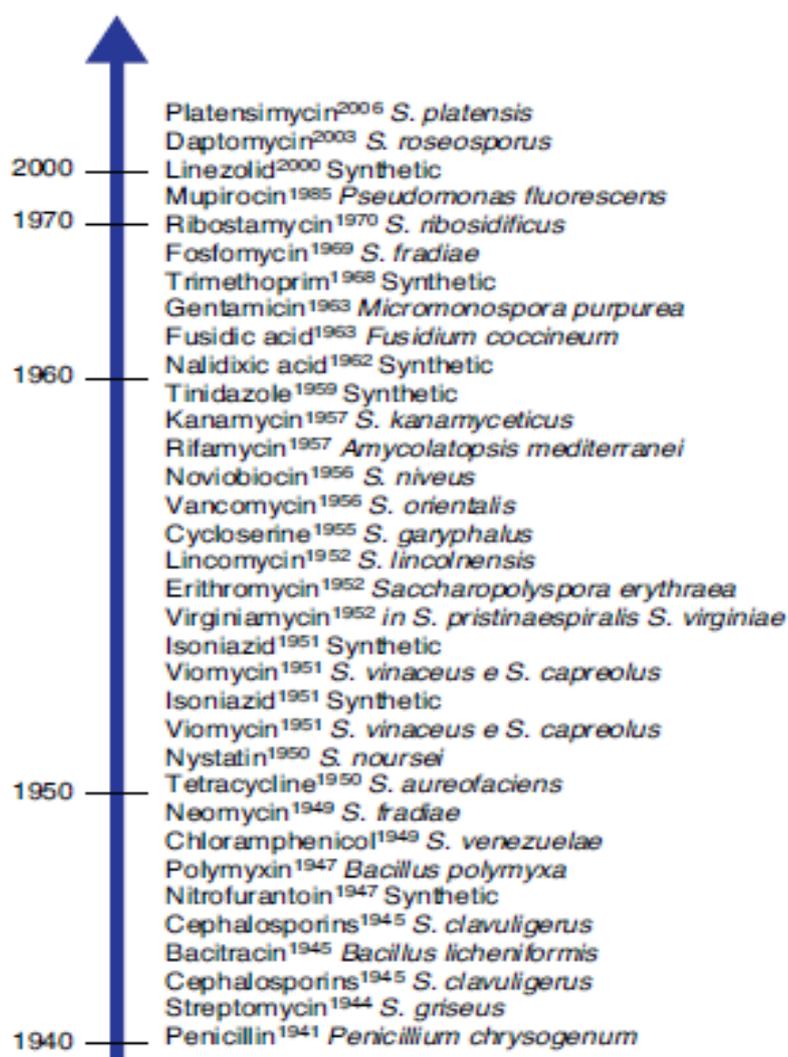


Figura 4: Destaque de antibióticos produzidos por algumas espécies de *Streptomyces* com suas respectivas datas de descoberta. Fonte: De Lima Procópio et al., 2012.

A maioria dos metabólitos secundários em *Streptomyces* sp. é produzida durante a fase intermediária entre a produção de micélio e a esporulação, acompanhando a diferenciação morfológica (Hwang et al., 2013).

Esses microrganismos têm grande importância industrial, correspondendo a 70% dos antibióticos hoje conhecidos. A produção de antibióticos está diretamente relacionada com o ciclo celular, que sofre influência de fatores, como variações nutricionais e fatores de regulação (Padilha, 1998) que precedem ou coincidem com o desenvolvimento da hifa aérea em culturas crescidas sobre superfícies (Bibb, 2005).

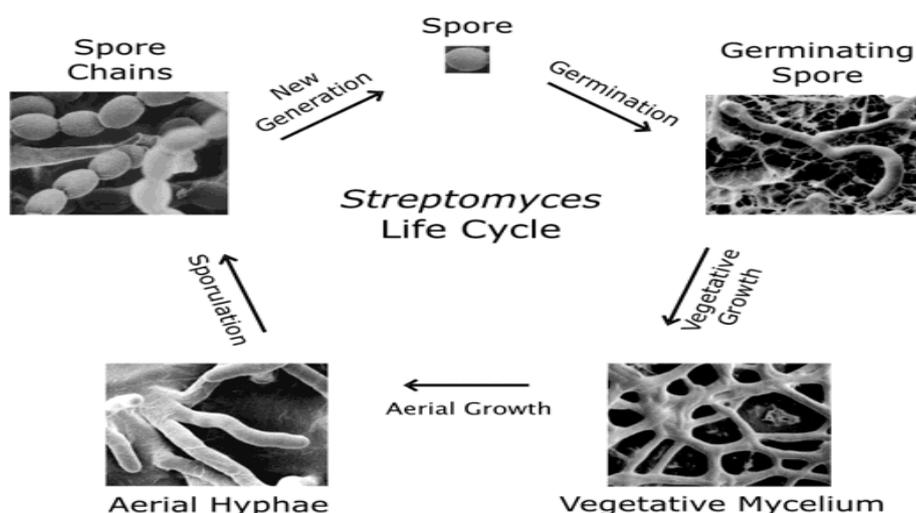


Figura 5: Ciclo do *Streptomyces* sp. Germinação de micélio vegetativo a partir de um esporo simples seguido por crescimento aéreo com produção de um micélio aéreo. As hifas produzidas passarão por septação para produzir esporos em compartimentos, que se dispersam iniciando-se um novo ciclo. Fonte: Mcgregor (1954).

3.6 Metabólitos secundários

Metabólitos secundários microbianos são moléculas que possuem uma grande variedade de estruturas químicas complexas, que são produzidas por

microrganismos logo que a fase exponencial de crescimento esteja terminando (Phaff, 1991).

Segundo Demai (1998) os metabólitos secundários são moléculas não essenciais para o crescimento, manifestando-se em diversas interações como antagonismos, sinergismos, exercendo efeito regulatório ou modulador entre microrganismos e outros sistemas vivos, como plantas, microfauna, mesofauna e animais. Estes compostos podem inibir ou causar a morte do organismo alvo, podendo ser específicos ou não com efeito tóxico (Vaishnav & Demain, 2010). Também conferem vantagens competitivas ao organismo produtor e podem ter ação como molécula sinalizadora (Berdy, 2005).

A versatilidade metabólica está nos produtos resultantes do metabolismo secundário como, por exemplo, os antibióticos que podem ser compostos naturais ou sintéticos capazes de inibir o crescimento ou causar a morte de um microrganismo. Podem ser classificados como bactericidas, quando causam a morte de bactérias, ou bacteriostáticos, quando promovem a inibição do crescimento microbiano (Guimaraes et al., 2010).

Esses metabólitos exercem ação contra diversos microrganismos, podendo ser antibacterianos, antifúngicos (Caffrey et al., 2008), anti-helmínticos e antitumorais (Olano et al., 2009), bem como ser utilizados na produção de imunossupressores (Graziani, 2009) e enzimas extracelulares (Insam, 2001).

Aproximadamente 16500 antibióticos já foram produzidos, porém somente cerca de 150 tem uso direto na medicina humana, veterinária e na agricultura (Demai, 1998, Challis & Hopwood, 2003, Berdy, 2005, El-Tarabity & Sivassthamparam, 2006).

3.7 *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*

Enterobacteriaceae é a família de bactérias compostas por bacilos Gram negativos, tendo como um dos representantes a *Escherichia coli*, capazes de fermentar glicose, de reduzir nitrato a nitrito e que apresentam reação de citocromo-oxidase negativa (Allen et al., 2008). A maioria das espécies desenvolve-se bem à temperatura de 37°C, entretanto algumas têm temperatura ótima entre 25 e 30°C e são frequentemente mais ativas metabolicamente a estas temperaturas. Existem gêneros psicotróficos frequentemente encontrados no solo, água e trato gastrointestinal de seres humanos e animais (Holt et al., 1994; ICMSF, 2000; Madigan et al., 2004).

A *Escherichia coli* é agente etiológico associado a infecções humanas em pacientes imunocomprometidos e suscetíveis às infecções hospitalares (Pitout 2008). É comumente isolada de ambientes clínicos e é um patógeno relacionado a diversas patologias extra-intestinais: infecções do trato urinário, bacteremia, osteomielite, meningite neonatal, entre outras (Hamzaoui et al., 2009; Rath et al., 2014). Apresenta mecanismo de resistência pela produção de beta-lactamases, constituindo grandes problemas na resistência a múltiplos fármacos (Rath et al., 2014).

Bactérias como *Pseudomonas aeruginosa* pertencem a família da Pseudomonadaceae, que são bacilos Gram-negativos, aeróbios ou anaeróbios, quimio-organotróficos e estão dispersos em diversos habitats como solo, água, plantas e animais. (Sharma et al., 2014). *Pseudomonas aeruginosa* é considerada um patógeno oportunista responsável por infecções hospitalares. (Sharma et al., 2014). É um agente, que acomete principalmente, pacientes imunocomprometidos, sendo um dos patógenos nosocomiais mais problemáticos

(Ferreira 2010). Além disso, *P. aeruginosa* coloniza frequentemente os pulmões de pacientes com fibrose cística, doença hereditária associada com o papel insuficiente dos canais de cloreto e retenção de muco no pulmão, reduzindo a função pulmonar e a expectativa de vida do paciente. (Mesaros et al; 2007). Um dos principais problemas associados com a terapia de infecções por este agente patogênico é a sua resistência a vários antimicrobianos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Parasitologia e de Bacteriologia, do Departamento de Microbiologia, Parasitologia e Imunologia, do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.

4.1 Condições de crescimento de *Acanthamoeba polyphaga*

Os experimentos foram realizados utilizando uma cepa (ATCC® 30872™) isolado ambiental de *Acanthamoeba polyphaga* que pertencente ao genótipo T4. As amebas foram cultivadas em meio PYG (2% de protease peptona, 0,2% de extrato de levedo e 1,8% de glicose) suplementado com estreptomicina e penicilina G à temperatura constante de 30°C em garrafas de cultivo celular (25cm²).

4.2 Condições de crescimento de *Streptomyces* sp.

O isolado R18 (6) do gênero *Streptomyces* sp. um actinomiceto endofítico isolado de raízes de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*), (De Oliveira, 2010), foi cultivado em placa de Petri contendo ágar amido caseína (ACA) (amido 1%; caseína 0,012% ; NaCl 0,2% ; KNO₃ 0,2%; K₂HPO₄ 0,2%; MgSO₄ 0,005%; FeSO₄ 0,001%; CaCO₃ 0,002%; ágar bacteriológico 0,6%) à temperatura de 30°C durante 7 dias.

4.3 Condições de crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*

Bactérias Gram-negativas, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*

de origem clínica, fornecidas pela Dra. Ana Lúcia Souza Antunes do Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da UFRGS foram cultivadas e mantidas em caldo tripticaseína de soja (TSB – Caldo Tripticaseína de Soja) incubado durante a 37°C, e realizado o perfil de susceptibilidade frente a antimicrobianos conforme (tabela 1).

Tabela 1: Perfil de susceptibilidade dos isolado Gram negativos aos antimicrobianos

Antimicrobianos	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
AMC	R	R
AMP	R	R
ATM	R	R
CAZ	R	I
CFL	R	R
CFO	R	R
CIP	R	R
CLO	R	R
CDP	R	R
CRO	R	R
CTX	R	R
ETP	S	R
EST	R	S
GEN	S	R
IMP	R	R
MER	S	R
NIT	R	R
NOR	R	R
SUT	R	R
TET	R	R

amoxicilina/clavulanato (AMC), ampicilina (AMP), aztreonam (ATM), ceftazidima (CAZ), cefalotina (CFL), cefoxitina (CFO), ciprofloxacina (CIP), cloranfenicol (CLO), cefpodoxima (CPD), ceftriaxona (CRO), cefotaxima (CTX), ertapenem (ETP), estreptomicina (EST), gentamicina (GEN), imipenem (IMP), meropenem (MER), nitrofurantoína (NIT), norfloxacina (NOR), sulfametoxazol/trimetoprim (SUT), tetraciclina (TET). R= Resistente; I= Intermediário; S= Sensível. Fonte: adaptação de Carvalho, (2014)

4.4 Cocultivo entre *Acanthamoeba polyphaga* e *Streptomyces* sp.

Para a realização dos experimentos, primeiramente foram recolhidos os trofozoítos que formavam a monocamada na garrafa de cultivo celular, em seguida o conteúdo celular foi centrifugado por 1500rpm, lavado uma vez em tampão fosfato salino (PBS) e realizado a contagem de trofozoítos em câmara de contagem Fuchs – Rosenthal de 10^6 trofozoítos/mL em acondicionados em nova garrafas de cultivo celular de 25 cm² em PBS 1X, em um volume de 5mL, e incubada a 30°C por 30 minutos para permitir a adesão.

Após este processo, em seguida foi realizada a contagem das células bacterianas em câmara de Neubauer em uma concentração de 10^7 esporos/mL. Logo após a contagem, os esporos foram adicionados à garrafa de cultivo celular junto com os trofozoítos, tendo como volume final 10 mL.

O experimento do cocultivo juntamente com os controles foram realizados em um único dia, ou seja, obtivemos um total de 84 garrafas de cultivo celular, onde 18 garrafas foram disponibilizadas para o controle de *A. polyphaga*, 33 garrafas para controle dos *Streptomyces* sp. e 33 garrafas para o cocultivo, todas as 84 garrafas foram incubadas a 30°C. As avaliações de viabilidade celular tanto das amebas como das bactérias foram verificadas em 24, 48, 72, 96, 120 e 144h, ou seja, eram retiradas por dia 9 garrafas de cultivo celular (3 controles amebas, 3 controles bactéria e 3 dos cocultivos) por dia, totalizando ao final deste experimento de viabilidade celular 54 garrafas de cultivo celular.

Para o ensaio de produção de extrato bruto, foi utilizado um total de 30 garrafas de cultivo celular sendo (15 garrafas para controle bactéria e 15 garrafas para os cocultivos). As garrafas eram mantidas em estufa de 30°C e as avaliações eram realizadas uma vez na semana por 5 períodos de incubação ou seja, em (24,

168, 336, 504 e 672h). O experimento teve um total de 28 dias como traz a (figura 6) onde foi realizado em triplicata e repetido pelo menos uma vez mais.

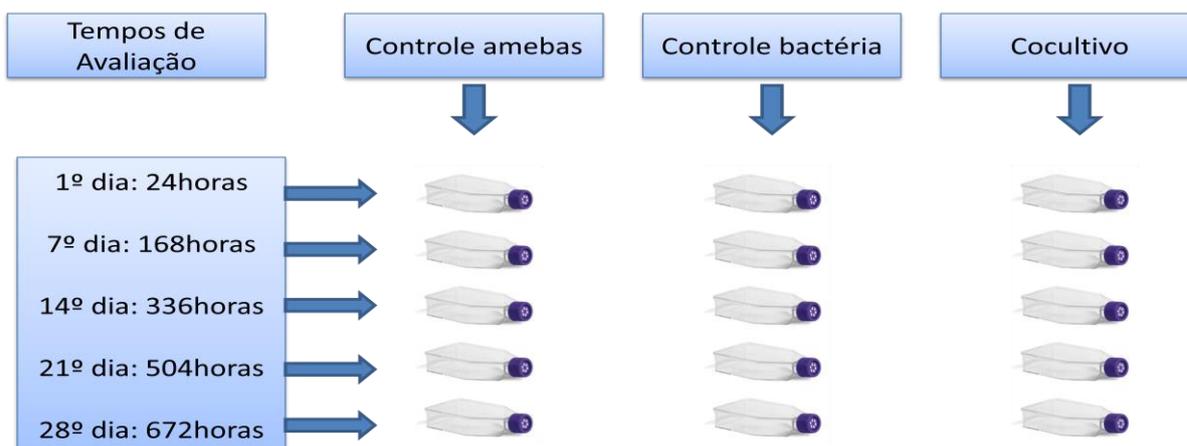


Figura 6: Modelo de cocultivo com seus respectivos tempos de incubação. Para avaliação da viabilidade celular das amebas e bactéria e cocultivo realizadas por 6 dias. E para a produção de extrato bruto as avaliações foram realizadas por 28 dias do controle das bactérias e do cocultivo.

4.5 Viabilidade amebiana após cocultivo

Para avaliar a viabilidade celular de *A. polyphaga* após cocultivo com *Streptomyces* sp. foi realizado o ensaio de exclusão com azul de tripano conforme Lamrabet et al. (2012). As células amebianas provenientes do cocultivo dos tempos de 24, 48, 72, 96, 120 e 144h foram retirados o conteúdo celular e alíquotas de 1mL foram coradas com solução de azul de tripano a 0,4% e contadas em câmara de Fuchs-Rosenthal para avaliação da viabilidade celular. O experimento foi feito em triplicata, com pelo menos uma repetição. O controle constituiu-se de trofozoítos de *A. polyphaga* incubados em PBS 1X, nos mesmos períodos de tempo.

4.6 Viabilidade bacteriana após cocultivo

Para avaliar a viabilidade dos esporos de *Streptomyces* sp. após o cocultivo, foram retirados a cada período de incubação (24, 48, 72, 96, 120 e 144h) onde era retirado o conteúdo celular em uma alíquotas de 1mL em seguida foram coradas com laranja de acridina, permitindo evidenciar a concentração bacteriana viável. Também foram realizadas duas diluições para cada amostra (10^{-1} , 10^{-2}) que em seguida foram semeado em ACA e incubadas a 30°C durante 5 dias para estimar o número de UFC (Unidades Formadoras de Colônia). Como controle, os esporos foram mantidos em PBS 1X, pelos mesmos períodos de tempo. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas.

4.7 Avaliação da atividade antimicrobiana através da técnica de dupla camada

Decorridos os tempos de 24h, 168h, 336h, 504h e 672h de cocultivo entre *Acanthamoeba* e *Streptomyces*, a atividade antimicrobiana foi avaliada utilizando-se a técnica de dupla camada.

As células provenientes do cocultivo foram retiradas da garrafa de cultivo, e em seguida lisadas pela passagem da suspensão sete vezes através de uma seringa com agulha de calibre 27G. (Moffat, & Tompkins. 1992). Um volume de 1 mL do lisado resultante foi semeado em placa contendo meio ACA e incubado por 5 dias a 30°C. Após o período de incubação, em uma nova placa contendo ACA inoculou-se, pelo método de picada, o crescimento celular do lisado do cocultivo, sendo incubado por mais 5 dias. Sobre o crescimento da picada foram vertidas suspensões bacterianas de *P. aeuruginosa* e *E. coli* multirresistentes contendo 1mL de

suspensão 10^8 UFC/mL que corresponde a 0,5 na escala McFarland e 9 mL de ágar Müller-Hinton fundido. As placas foram incubadas durante 24/48 horas a 37 °C. Após este período foram realizadas medidas dos halos de inibição com auxílio de uma régua, determinando a atividade antimicrobiana qualitativa do cocultivo e do controle, contra as respectivas bactérias Gram negativas. Como controle foi utilizado o *Streptomyces* sp. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Os halos foram medidos em duas direções e destas medidas foi calculada a média.

4.8 Produção de extrato bruto do cocultivo

Para a produção do extrato bruto, o conteúdo celular do cocultivo após passar por lise, foi adicionado em ACA e incubado durante 5 dias e as colônias resultantes foram utilizadas para fazer um pré-inóculo. As colônias foram retiradas da placa com uma alça de platina e inoculadas em erlenmeyers de 250mL contendo 50mL de caldo amido caseína, incubados por 48 h a 30°C, sob agitação de 100 r.p.m. Em seguida, para a obtenção de extrato bruto do cocultivo retirou-se 5mL deste pré-inóculo e transferiu-se para novos frascos erlenmeyers contendo o mesmo meio base e incubou-se por 10 dias a 30 °C sob agitação de 100 r.p.m. A avaliação do extrato bruto do cocultivo foi realizada a cada 24h, (figura 7). A cada dia o cultivo era centrifugado a 5.000 r.p.m por 10 minutos para separação da massa celular e do sobrenadante era retirada uma alíquota para nova centrifugação a 13.000 r.p.m durante 10 minutos a fim de obter um extrato isento de células, para realização do teste de difusão em poço. Todo ensaio foi realizado em triplicata.

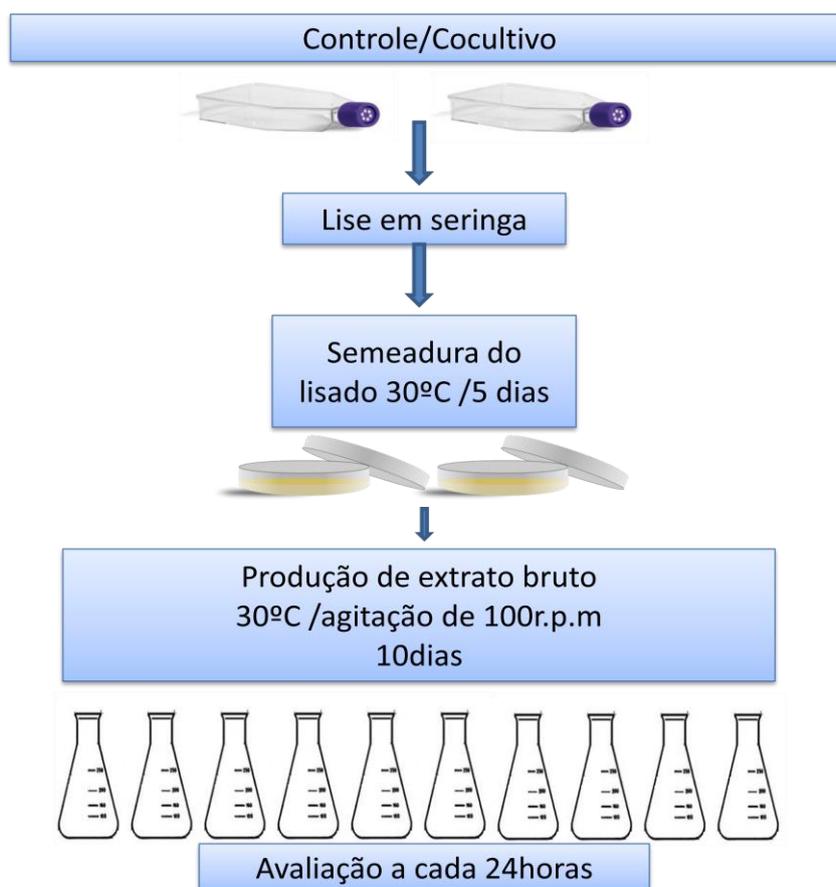


Figura 7: Processo para produção de extrato bruto do controle e cocultivo.

4.9 Testes de antibiose por difusão em poço

A técnica de difusão em poço consistiu em semear com auxílio de um suabe uma concentração celular de 10^8 UFC/mL das bactérias *P. aeruginosa* e *E. coli* sobre uma placa contendo 20 mL de ágar tripton de soja (TSA). Após a semeadura foram feitos poços no ágar com o auxílio de cilindros de aproximadamente 9mm de diâmetro distribuídos equidistantes na placa. A cada poço foram adicionados 100 μ L de extrato bruto de cocultivo que haviam apresentado atividade antimicrobiana no teste de dupla camada.

Após a adição do extrato bruto nos poços, a placa foi incubada por 24 h a 4°C para o extrato difundir-se no meio de cultura. Posteriormente a placa foi incubada por 24/48h a 37°C (figura 8). Em seguida foram realizadas medições dos halos de inibição formados pelos extratos brutos e controle, frente aos microrganismos *E. coli* e *P. aeruginosa*. Todo experimento foi realizado em triplicata.

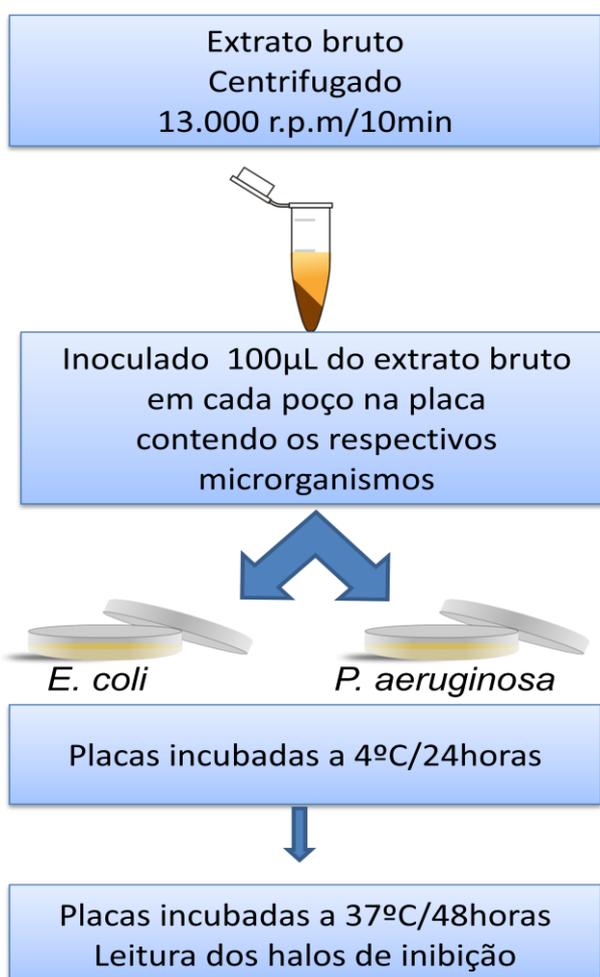


Figura 8: Processo do teste de difusão em poço dos extratos brutos do cocultivo e controle (*Streptomyces* sp) contra *E. coli* e *P. aeruginosa*.

4.10 Avaliação da produção de biomassa (peso seco)

Este experimento teve como objetivo avaliar o volume de biomassa produzida do cocultivo e do controle (*Streptomyces* sp.), em cada período de tempo.

Depois de produzido o extrato bruto, conforme descrito no item 4.8, a produção de biomassa celular foi avaliada. Para a determinação do peso seco, os tubos Falcon 50 mL vazios foram previamente pesados (peso inicial), e posteriormente preenchidos com a cultura e centrifugados a 5.000 r.p.m por 10 minutos, o sobrenadante foi separado do sedimento. (figura 9). Os frascos contendo sedimentos foram colocados para secagem (2 a 7 dias em estufa de 50°C) e depois foram novamente pesados em balança de precisão. O peso seco foi determinado pela diferença entre o peso inicial (frascos vazios) e peso final (com conteúdo celular).

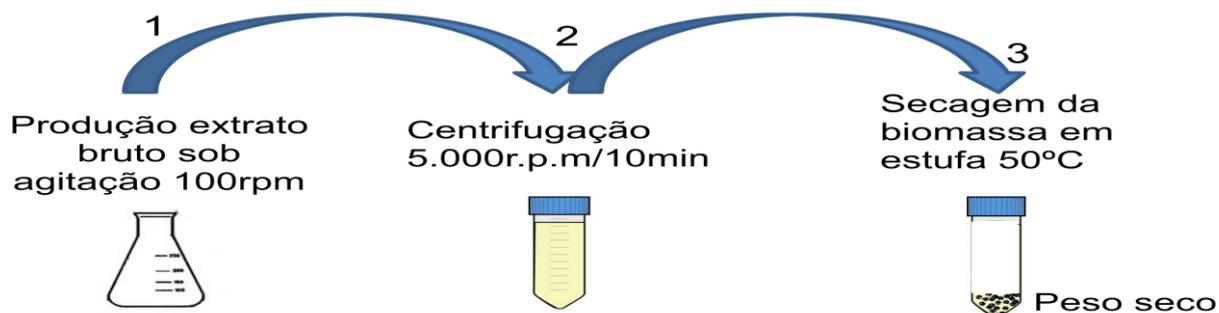


Figura 9: Procedimento de separação de extrato bruto e massa celular. Processo de produção do extrato bruto em agitação (1). Extrato bruto centrifugado a 5000RPM/10 minutos (2). Separação da massa celular para realização do peso seco. (3)

4.11 Avaliação da atividade do sobrenadante do cocultivo contra *E. coli* e *P. aeruginosa*

Após realizar cocultivo como descrito no item 4.4, para este teste foi realizado a avaliação somente do sobrenadante do cocultivo e respectivos controles. Foram retirados conteúdos celulares das garrafas de cultivo celular e em seguida centrifugadas a 13.000 r.p.m por 10 minutos. Após centrifugação foi realizada o teste de antibiose por difusão em poço como descrita no item 4.9 em que alíquotas de 100µl do sobrenadante foram adicionadas a placas previamente semeadas com *P. aeruginosa* e com *E. coli*. Após 24/48h foi realizada a medição dos halos de inibição. Todo experimento foi realizado em triplicata.

4.12 Avaliação da atividade do lisado do cocultivo contra *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*

O experimento foi realizado conforme descrito em 4.4, porém após centrifugação, o sobrenadante foi lisado, ou seja, passado sete vezes por uma seringa com agulha de calibre 27G para a completa lise e em seguida adicionado na placa para difusão em poço como descrito no item 4.9 para testar sua atividade contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* multirresistentes. O teste foi realizado nas mesmas condições de temperatura, tempo e leitura dos halos de inibição. Todo experimento foi realizado em triplicata.

4.13 Teste do sobrenadante semeado do cocultivo contra *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*

A análise do sobrenadante semeado visou verificar se este conteúdo apresentaria atividade contra as bactérias Gram negativas. O experimento foi realizado da mesma forma como descrito no item 4.4, porém após obter o sobrenadante, o mesmo foi semeado em ágar amido caseína (ACA), e incubado a 30°C, por apenas 2 dias de crescimento, com objetivo de verificar se em um curto período de crescimento, influenciaria na ação antimicrobiana.

Após estes dois dias de crescimento, o conteúdo celular foi ressuspendido em PBS 1X e raspado com auxílio de alça de platina, esse conteúdo celular foi centrifugado a 13.000 r.p.m por 10 minutos e em seguida o sobrenadante foi testado pelo método de antibiose por difusão em poço como descrito no item 4.9 contra *P. aeruginosa* e *E. coli*. Todo o teste foi realizado nas mesmas condições de temperatura, tempo e leitura dos halos de inibição e em triplicata.

4.14 Avaliação da atividade do extrato bruto do cocultivo contra trofozoítos e cistos de *A. polyphaga*

Neste teste avaliou-se a atividade dos extratos brutos do cocultivo contra trofozoítos e cistos de *A. polyphaga*. Para este experimento 100µL de uma suspensão contendo $1,6 \times 10^5$ trofozoítos foi adicionado à microplaca de 96 poços contendo 100µL dos extratos que apresentaram maior atividade antimicrobiana. Foram testados os extratos brutos do cocultivo e controle do 1º e 21º tempo de incubação. Foram selecionados respectivamente os extratos do terceiro dia de cada tempo com melhor atividade. A avaliação foi realizada em 24 e 48 horas em concentração de 1:1, 1:2 e 1:4, (figura 10) e em seguida foi avaliada a viabilidade utilizando corante de exclusão azul de tripano através de contagem com câmara de

Fuchs Rosenthal. Todo o experimento foi realizado em triplicata. O mesmo procedimento descrito acima foi realizado para cistos.

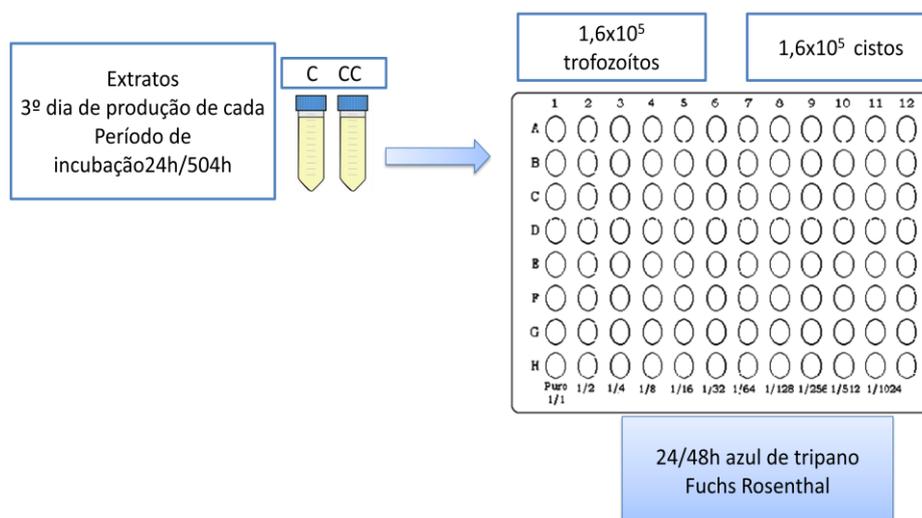


Figura 10: Avaliação da atividade dos extratos brutos produzidos no 3º dia do tempo de incubação de 24 horas e 504 horas do controle e cocultivo.

4.15 Análise estatística

Os resultados obtidos com teste de difusão em poço e da biomassa foram aplicados a análise de variância (ANOVA) multifatorial e o teste de comparação de múltiplas médias (teste de Tukey), considerando 95% de significância. O programa utilizado foi o BioEstat 12.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

O presente estudo teve como objetivo verificar a interação entre *A. polyphaga* e *Streptomyces* sp., sendo este o primeiro estudo que utiliza o modelo de cocultivo entre protozoário e bactéria, visando a obtenção de extrato bruto com ação antimicrobiana.

5.1 Viabilidade amebiana após cocultivo

A fim de verificar a viabilidade amebiana de *A. polyphaga* após cocultivo com *Streptomyces* sp., utilizou-se o corante vital azul de tripano. O cocultivo foi realizado em PBS 1X e a avaliação foi realizada por um período de incubação de 6 dias, onde visualizou-se um decréscimo na viabilidade celular amebiana. (figura 11).

Foi possível verificar que no tempo inicial de 24h houve um declínio na viabilidade celular amebiana, que foi progressivo até o tempo final de 144h, demonstrando assim que houve uma inviabilidade total de 11% das amebas em cocultivo.

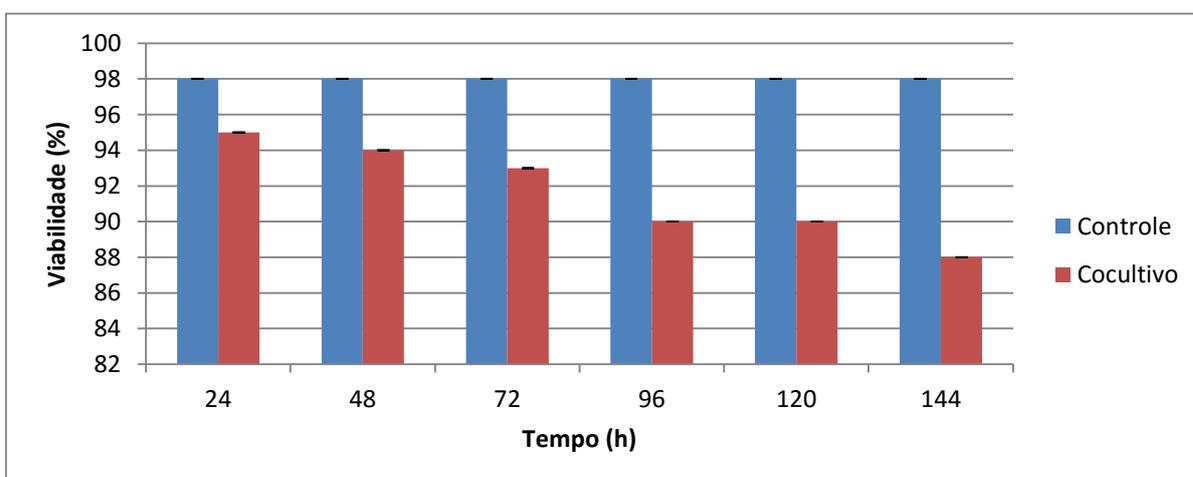


Figura 11: Viabilidade de *A. polyphaga* em cocultivo com *Streptomyces* sp. ao longo do tempo.

Estes resultados mostraram que *Streptomyces* sp. influenciou na diminuição da viabilidade amebiana, o que provavelmente se deve à produção de compostos bioativos, já relatada para este gênero bacteriano. Isto corrobora com experimentos de cocultivo de *Acanthamoeba polyphaga* e *Streptomyces californicus* apresentados por Yli-Pirilä et al. (2006) demonstrando uma redução significativa na viabilidade e sobrevivência de amebas, a partir do sétimo dia de cocultivo.

O mesmo foi relatado no estudo de Lamrabet et al. (2012) em que cocultivo de *Mycobacterium smegmatis* e *Acanthamoeba polyphaga* ao longo de cinco dias resultou em lise das ameba e aumento significativo do crescimento de *M. smegmatis*. No presente estudo foi possível visualizar o aumento do crescimento de *Streptomyces* sp. em cocultivo (Figura 12), em contraste com o controle (figura 13) que permaneceu somente na fase de esporo.

Isto pode ter ocorrido pelo fato de as amebas começarem a encistar-se devido à escassez de nutrientes apresentando características como: aumento na densidade citoplasmática, expulsão de água das vesículas e redução do volume do nucléolo para cerca de 80%. Sugere-se que poderia ser esta a fonte alimentar para o desenvolvimento de *Streptomyces* sp. (Bowers & Korn 1969). Outra possibilidade seria a de que os esporos de *Streptomyces* tenham sido fagocitados pelos trofozoítos amebianos e ali encontrado nutriente para desenvolver-se (Yli-Pirilä et al 2006).

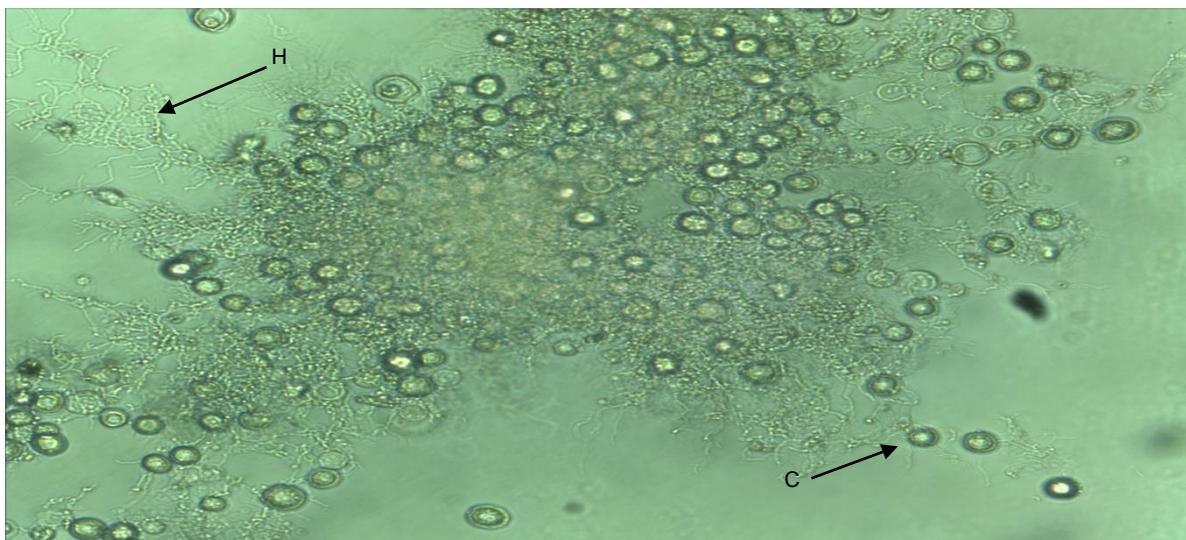


Figura 12: Cocultivo no tempo de incubação de 21 dias. Verifica-se alteração morfológica de *Streptomyces* sp. em contato com *A. polyphaga* (C) onde há desenvolvimento de um conjunto de hifas (H).

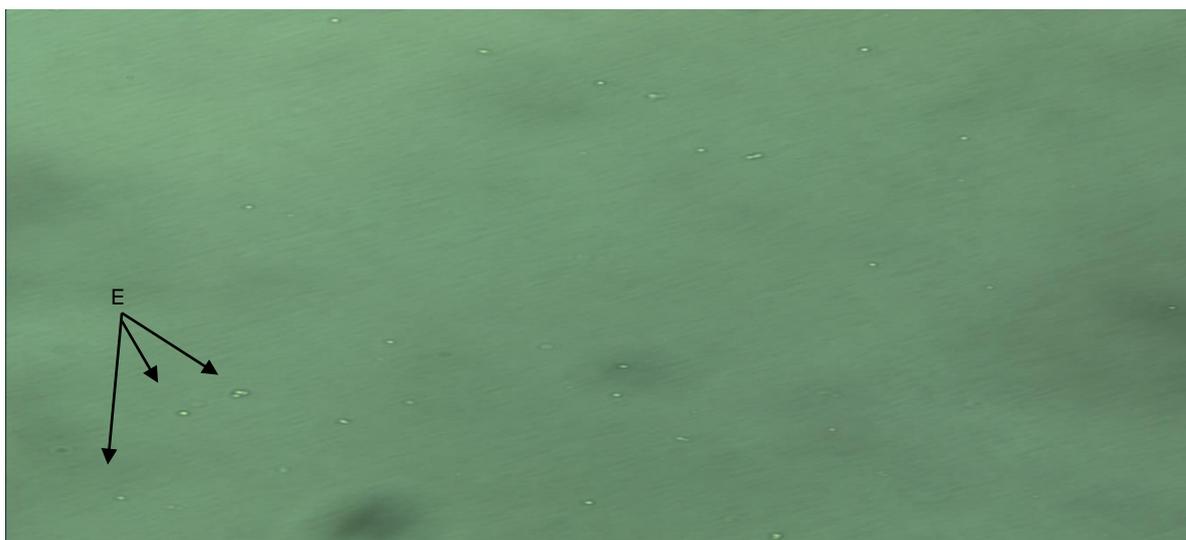


Figura 13: Controle do *Streptomyces* sp. (E) esporos no tempo de 14^o tempo de incubação, se mantendo na forma de esporo até tempo final do 28^o tempo de incubação.

5.2 Viabilidade bacteriana após cocultivo

A viabilidade das células bacterianas (esporos) foi avaliada após o cocultivo, com o propósito de analisar se o contato dos trofozoítos com os esporos afetaria a viabilidade celular de *Streptomyces* sp. e se haveria influência no crescimento celular. O teste realizado com corante laranja de acridina demonstrou viabilidade celular dos esporos, e quanto ao crescimento celular, houve significativo aumento da quantidade de esporos, impossibilitado a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC), em duas diluições seriadas (10^{-1} , 10^{-2}). Os esporos desenvolveram-se e houve formação de hifas logo após as 24 horas de análise, comprovando que ocorreu o desenvolvimento de *Streptomyces* sp. em comparação ao controle, onde o organismo permaneceu sob a forma de esporo.

O estudo realizado por Yli-Pirilä et al., em 2006, mostrou através do cocultivo de *A. polyphaga* com fungos *Aspergillus versicolor* e *Penicillium spinulosum*, que a associação não influenciou no crescimento amebiano, porém ambos os fungos se beneficiaram da presença de amebas, uma vez que o número total de esporos viáveis foi significativamente maior em cocultivo do que nos controles, durante os primeiros 3 dias de incubação.

5.3 Avaliação da atividade antimicrobiana do cocultivo pelo teste de dupla camada

A fim de avaliar a atividade antimicrobiana do cocultivo, foi aplicada a metodologia qualitativa de dupla camada, que analisa a possível produção de compostos bioativos com ação antimicrobiana resultante desta associação. Para isso foram utilizadas as bactérias Gram negativas multirresistentes *Escherichia coli* e

Pseudomonas aeruginosa.

Uma característica importante visualizada foi que, em 24 horas de análise havia um halo de inibição forte e que em 48 horas havia outro halo de inibição, porém mais fraco (Figura 14). Desta forma pode-se sugerir que os compostos bioativos exerceram maior atividade nas primeiras 24h e que esta decaiu ao longo do tempo ou que outros compostos menos ativos foram sendo produzidos com ação bacteriostática.

Em um estudo realizado por Tanvir et al. (2013) verificou-se que 42 isolados de actinomicetos endofíticos do gênero *Streptomyces* sp. apresentaram atividade antimicrobiana contra os patógenos multirresistentes *E. coli* e *P. aeruginosa*. Antunes et al. (2013) também descreveram ação antimicrobiana de isolados do gênero *Streptomyces* sp. pela metodologia de dupla camada, contra *Enterococcus*, um importante microrganismo associado a infecções nosocomiais.

Portanto, no presente estudo foi possível demonstrar através do teste de dupla camada que houve ação antimicrobiana contra *E. coli* e *P. aeruginosa*, tanto no cocultivo como no controle *Streptomyces* sp.

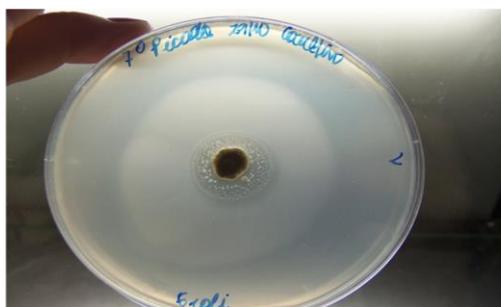
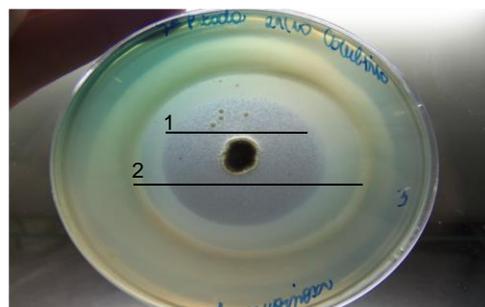
A: Controle: *E. coli*C: Controle: *P. aeruginosa*B: Cocultivo: *E. coli*D: Cocultivo: *P. aeruginosa*

Figura 14: Teste de dupla camada pelo método de picada. Tempo de 168 horas de incubação. Tanto controle como cocultivo apresentaram halos de inibição, contra A e B: *E. coli* e C e D: *P. aeruginosa*, barras representam halos de inibição, (1) mais forte, (2) mais fraco.

5.4 Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato bruto do cocultivo pela difusão em poço

Utilizando a técnica de difusão em poço (conforme descrito no item 4.9), avaliou-se a atividade antimicrobiana dos extratos brutos produzidos pelo cocultivo e também pelo controle (*Streptomyces* sp.), ao longo período de 50 dias, ou seja, avaliado em 10 dias para cada tempo de incubação (1^o, 7^o, 14^o, 21^o e 28^o) conforme ilustrado na figura 5. A cada dia era realizado o teste de atividade antimicrobiana, através da medição dos halos de inibição do crescimento de *E. coli* e *P. aeruginosa*

como demonstra na (Figura 15).



A: Controle:*E. coli*



C: Controle:*P. aeruginosa*



B: Cocultivo:*E. coli*



D: Cocultivo:*P. aeruginosa*

Figura 15: Teste de difusão em poço. Tanto controle como cocultivo apresentaram halos de inibição, contra A e B: *E. coli* e C e D: *P. aeruginosa*. A figura refere-se ao extrato do oitavo dia da avaliação do 1º inoculação.

Carvalho (2014) demonstrou em seu trabalho o perfil de suscetibilidade a diversos isolados Gram negativas, como por exemplo, *E. coli* 70 e *P. aeruginosa* 59, apontando que tais microrganismos foram multirresistentes a mais de duas classes de antimicrobianos, assim podendo afirmar que 92% dos isolados foram multirresistentes aos antimicrobianos.

Salamoni et al. (2012) avaliaram a ação antimicrobiana de extratos produzidos por um isolado do gênero *Streptomyces*, que mostraram eficácia frente a bactérias resistentes a antimicrobianos. Portanto, os extratos apresentaram ação contra microrganismos de interesse clínico, incluindo *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA), *Enterococcus faecium* e *Salmonella enteritidis*, caracterizando assim esse isolado de *Streptomyces* sp. como um produtor de compostos bioativos.

Diante disto, o presente trabalho teve como objetivo verificar se os isolados *P. aeruginosa* e *E. coli*, ambos multirresistentes seriam inibidos pelos extratos brutos provenientes do cocultivo (*Acanthamoeba polyphaga* e *Streptomyces* sp.) e controle (*Streptomyces* sp.) ao longo do período de avaliação.

Com base na figura 16, pode-se observar que houve atividade antimicrobiana dos extratos produzidos tanto do cocultivo quanto do controle a partir do segundo dia de avaliação. O cocultivo mostrou atividade superior ao controle a partir do terceiro dia, tanto para *E. coli* quanto para *P. aeruginosa*. Houve um breve declínio no sexto dia contra *E. coli*, mas permaneceram ativos contra *P. aeruginosa*. Do sétimo dia em diante novamente verificou-se atividade antimicrobiana contra ambos, sendo, no entanto sempre maior contra *P. aeruginosa* do que contra *E. coli*.

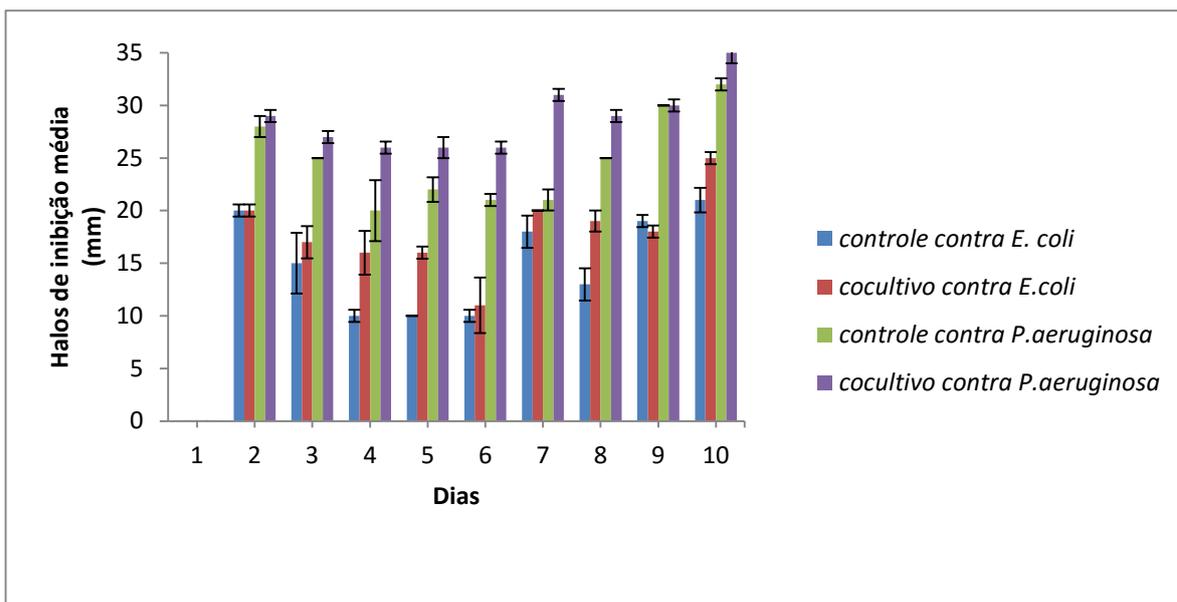


Figura 16: Avaliação da atividade antimicrobiana ao longo de 10 dias, após 24 horas (1º dia) de incubação do cocultivo e controle, testados contra *E. coli* e *P. aeruginosa*.

Na avaliação da atividade antimicrobiana no (7º) tempo de incubação ou após 168 horas (Figura 17), pode-se observar que os extratos brutos do cocultivo e controle mantiveram a atividade a partir do segundo dia tanto contra *E. coli* como *P. aeruginosa*. Já nos dias nove e dez podemos observar que somente o extrato do cocultivo teve ação tanto para *E. coli* como para *P. aeruginosa*.

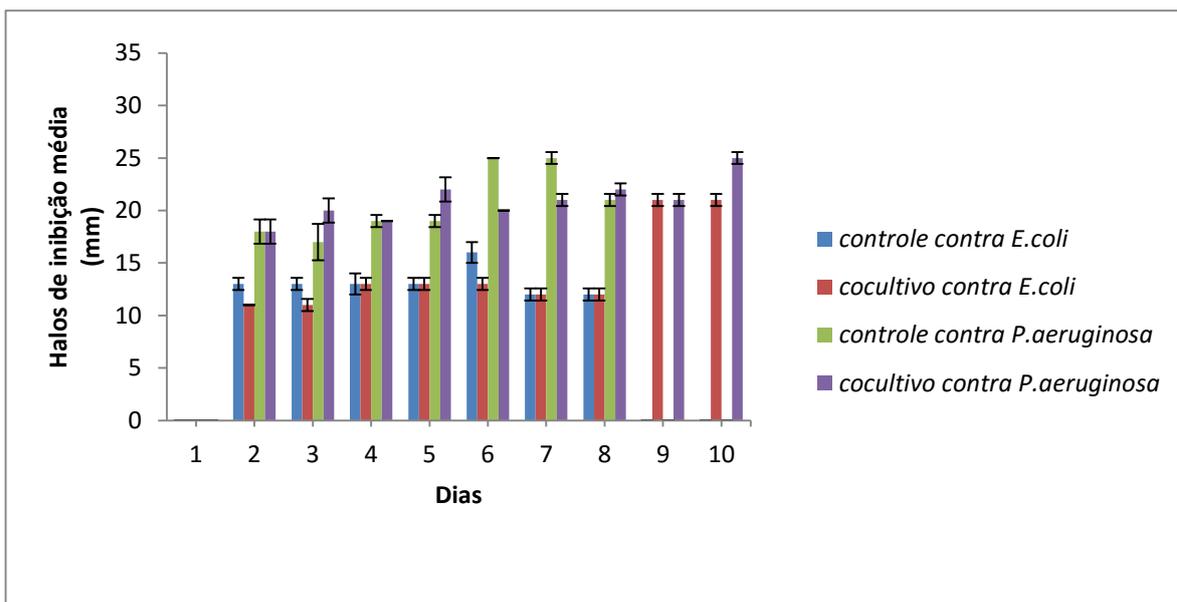


Figura 17: Avaliação da atividade antimicrobiana em 10 dias, após 168 horas (7^o) tempo de incubação do cocultivo e controle, testados contra *E. coli* e *P. aeruginosa*.

Utilizando um cocultivo de 14 dias ou 336 horas da avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos (figura 18), mostrou um declínio a partir do quarto dia na atividade contra *E.coli* e *P.aeruginosa*, que a partir daí aumentou apenas contra *P.aeruginosa* e manteve-se constante para *E.coli*.

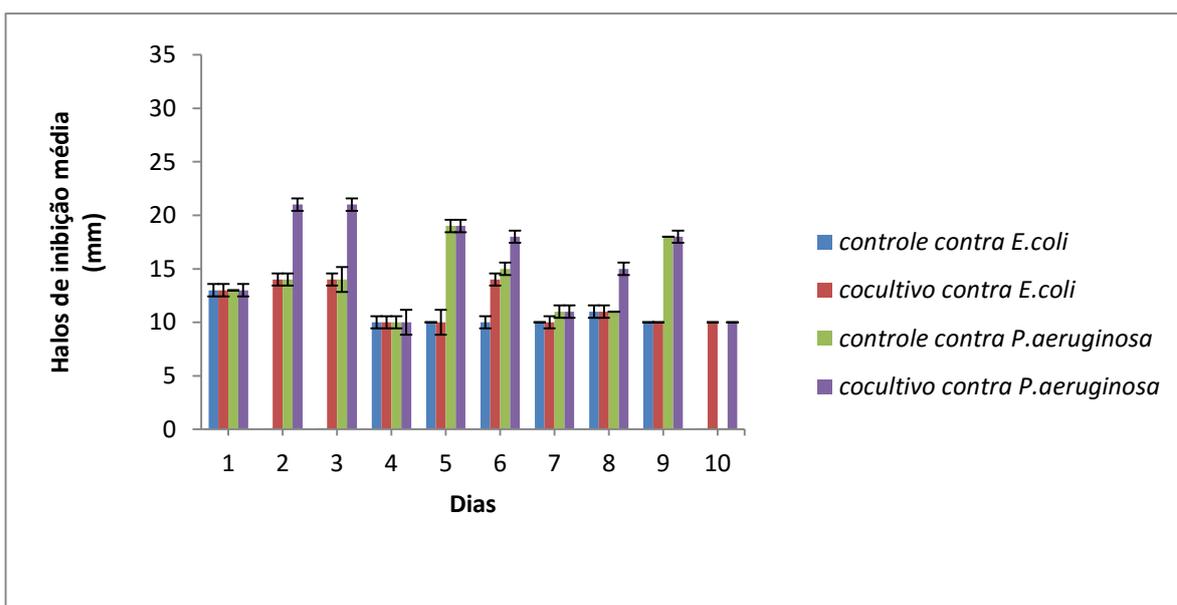


Figura 18: Avaliação da atividade antimicrobiana em 10 dias, após 336 horas (14^o) tempo de incubação do cocultivo e controle, testados contra *E. coli* e *P. aeruginosa*.

A atividade antimicrobiana do tempo de 21 dias ou 504 horas (figura 19), mostrou que somente a partir do segundo dia inicia-se uma ação antimicrobiana e que extratos do cocultivo tiveram maior atividade do que os controles, principalmente contra *P. aeruginosa*. Pode-se observar também que não houve nenhuma atividade dos extratos produzidos pelo controle (*Streptomyces* sp.) contra *E. Coli*, porém o extrato do cocultivo mostrou atividade contra esta bactéria. No décimo dia, os extratos não mostraram mais atividade antimicrobiana.

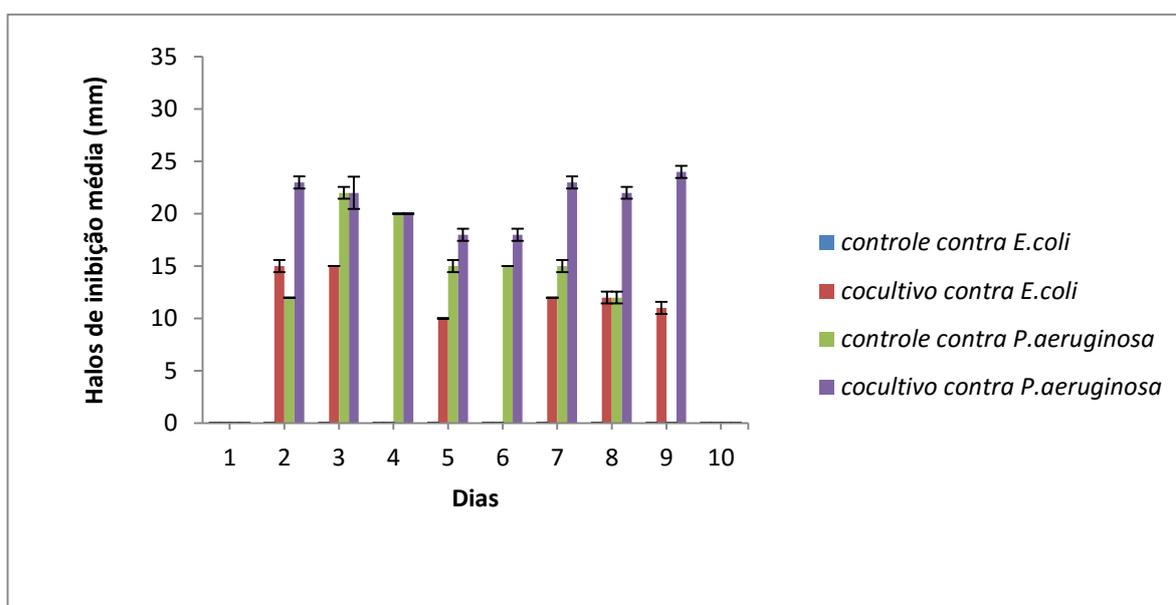


Figura 19: Avaliação da atividade antimicrobiana em 10 dias, após 504 horas (21º) tempo de incubação do cocultivo e controle, testados contra *E. coli* e *P. aeruginosa*.

A atividade antimicrobiana dos extratos brutos de um cocultivo de 28 dias, (672 h), verifica-se através da (figura 20) que a atividade antimicrobiana é menor, tendo ocorrido apenas até o quarto dia de avaliação. Os extratos tanto do controle quanto do cocultivo contra *E.coli* e *P.aeruginosa* apresentaram atividade somente no

primeiro e segundo dias. No terceiro e quarto dias observou-se atividade dos extratos brutos somente contra *P. aeruginosa*.

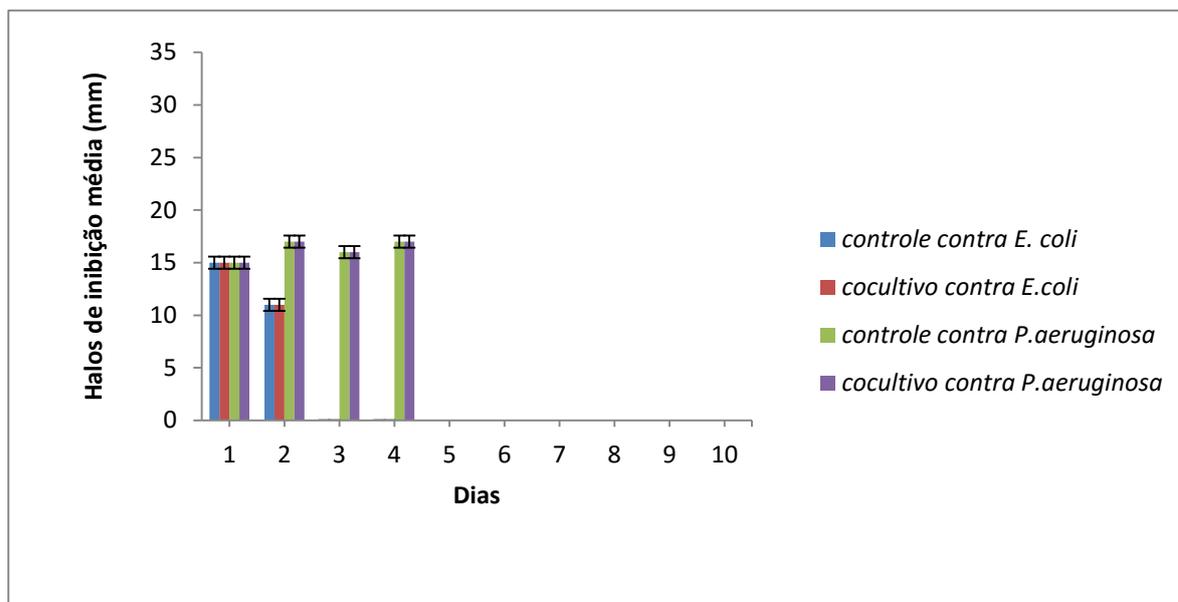


Figura 20: Avaliação da atividade antimicrobiana em 10 dias, após 672 horas (28º) do tempo de incubação do cocultivo e controle, testados contra *E. coli* e *P. aeruginosa*.

De acordo com análise estatística de variância (ANOVA) dos dados apresentado na tabela 1, pelo teste Tukey, pode se observar o efeito do tempo de incubação e o efeito microrganismos onde os mesmos apresentaram diferenças significativas pelos valores de ($p < 0,05$) também é possível verificar que não há um efeito significativo entre os demais.

O cocultivo mesmo não mostrando uma diferença significativa, comportou-se como melhor extrato bruto diante dos microrganismos *E. coli* e *P. aeruginosa*.

Podemos afirmar que o tempo de incubação de 24 horas (1º) foi o melhor para produção de extrato bruto com ação antimicrobiana. Quanto ao microrganismo,

P. aeruginosa, foi o que apresentou maior sensibilidade. Porém, quanto ao extrato bruto do cocultivo e do controle, comportaram-se diferentemente um do outro, mas as diferenças não foram estatisticamente significativas.

Tabela 2 - Teste univariado de importância para halos parametrização Sigma-restrito - Hipótese de Decomposição Eficaz

Efeito	SS	Grau de Liberdade	MS	F	P
CC/C	12,9654	1	12,9654	1,513	0,219252
Tempo incubação	154,3481	4	38,5870	4,503	0,001387**
Microrganismos	73,5000	1	73,5000	8,577	0,003554**
Dias	45,7303	9	5,0811	0,593	0,803294
CC/C*Tempo incubação	7,4644	4	1,8661	0,218	0,928550
CC/C*Microrganismos	0,0024	1	0,0024	0,000	0,986655
Tempo incubação*Microrganismo	10,1628	4	2,5407	0,296	0,880264
CC/C*Dias	7,0316	9	0,7813	0,091	0,999746
Tempo incubação*Dias	134,0356	36	3,7232	0,434	0,998500
Microrganismos*Dias	14,8490	9	1,6499	0,193	0,994928
Erro	60,7943	521,0000	8,569878	-	-

CC:cocultivo. C: controle. ** diferença significativa ($p < 0,05$).

Com base nos gráficos das avaliações das atividades antimicrobianas ao longo de cinco tempos de incubação (1^o, 7^o, 14^o, 21^o e 28^o dias) com produção de extratos brutos em cinquenta dias, tanto de controle (*Streptomyces* sp.) quanto de cocultivo. Podemos sugerir que *A. polyphaga* pode ter induzido ou otimizado a produção de diferentes compostos com ação antimicrobiana por *Streptomyces* sp.

Outra possibilidade seria de que *Streptomyces* sp. possa ter se beneficiado da ameba, como nutriente ou de fatores que mesma tenha liberado no ambiente e

assim favorecendo o seu crescimento. Além disso, o contato dos dois microrganismos pode ter induzido a produção de algum composto pela *A. polyphaga* pelo fato da mesma vir a fagocitar os esporos e estes ter desencadeado a produção de diferentes compostos.

Sabemos que os microrganismos em cocultivo são compostos por comunidades microbianas naturais que são onipresentes na natureza. (Ross-Davis et al. 2013). Em geral microrganismos que compartilham nichos ecológicos específicos, sejam estes procariontes (bactérias, arqueobactérias), eucariontes (protistas, fungos) ou até mesmo os vírus, podem crescer e sobreviver em um mesmo ambiente, desde que as fontes de nutrientes sejam suficientes, podendo assim haver relações mutualísticas ou antagonistas. (Beck et al. 2012).

No entanto, a possibilidade de crescimento e sobrevivência é limitada a alguns grupos de microrganismos, só podendo se desenvolver em culturas específicas, utilizando meios de cultura adaptados. Outros microrganismos são impossíveis de cultivar artificialmente devido à dependência de interações, podendo ser necessária a presença de outro microrganismo para que se desenvolvam (Bertrand et al., 2014).

A coexistência de vários microrganismos que compartilham o mesmo nicho pode afetar seu crescimento, seja nos padrões de adaptação, morfológico ou até mesmo na capacidade de sintetizar proteínas e metabólitos secundários (Rico-Gray, 2001). Assim, as comunidades microbianas têm uma grande influência em seu ambiente imediato e até em um possível hospedeiro (Sandland et al., 2007).

Segundo Baltz (2008), a diversidade de metabólitos secundários é representada por modificações genéticas (transferência horizontal de genes, mutações pontuais, duplicação genética, deleções parciais ou totais de genes,

recombinação homóloga e transposições) e por modificações ambientais (temperatura, pH, fonte de nutricional).

Pesquisadores vêm aplicando métodos na modificação das condições de crescimento, modificação epigenética como também em cocultivos microbianos, a fim de induzir a produção de metabólitos secundários que normalmente não são observados em condições laboratoriais (Cichewicz 2010).

O cocultivo de microrganismos também pode resultar em mutação genética e expressão subsequente de agrupamentos de genes de forma silenciosa (Charusanti et al., 2012). Muitas outras pesquisas sobre cocultivo de microrganismos mostraram que a interação entre dois microrganismos pode ativar grupamentos de genes silenciosos. Na verdade, os microrganismos podem produzir compostos que funcionariam como reguladores da transcrição e modificadores epigenéticos. (Konig et al., 2013).

Em um estudo realizado por Carlson et al. (2014), verificou-se através do modelo de cocultivo entre *Streptomyces* sp. com quatro cepas patogênicas do filo Proteobacteria a produção do antibiótico resistomicina. Assim foi possível observar que estas cepas testadas induziram a produção do antibiótico por *Streptomyces* sp., sugerindo que a regulação do metabolismo secundário entre estas bactérias é dependente da espécie bacteriana presente no meio ambiente. Estes resultados suportam a noção de que a produção de pequenas moléculas em bactérias nem sempre é mantida, mas pode variar conforme contato com determinado microrganismo.

Porém, pouco se sabe sobre a especificidade da regulação dos metabólitos secundários em bactérias, bem como as condições em que uma bactéria produz um antibiótico e a extensão em que ela faz isso no reconhecimento

de uma espécie no ambiente concorrente.

Neste contexto, é de extrema importância estudar os microrganismos em interação, onde os mesmos possam ativar/induzir a produção de novos compostos biotivos que possam auxiliar na regulação positiva de uma grande variedade de compostos que possam ser produzidos por competição de nutriente ou espaço quando cocultivados.

5.5 Avaliação da produção de biomassa (peso seco)

Este experimento teve como objetivo avaliar a produção de massa celular no mesmo período da produção de extrato bruto, tanto do cocultivo como do controle, verificado durante dez dias para cada tempo de incubação (1^o, 7^o, 14^o, 21^o e 28^o dia).

Em relação à biomassa, foi possível visualizar produção de massa celular durante todos os dias, de cada tempo de incubação, tanto no cocultivo como no controle. Através de dados estatísticos, pode-se afirmar que a biomassa produzida pelo cocultivo em comparação ao controle não houve diferença significativa.

A partir deste resultado obtido, podemos afirmar que a produção de biomassa do cocultivo foi superior ao controle (figura 18).

Sugerimos que este fator possa ter sido desencadeado por um dos microrganismos em cocultivo, seja *Acanthamoeba polyphaga* ou *Streptomyces* sp. ou por ambos, que podem ter fornecidos nutrientes para suplementar o meio em que se encontravam durante a incubação sob agitação, favorecendo assim a produção de biomassa.

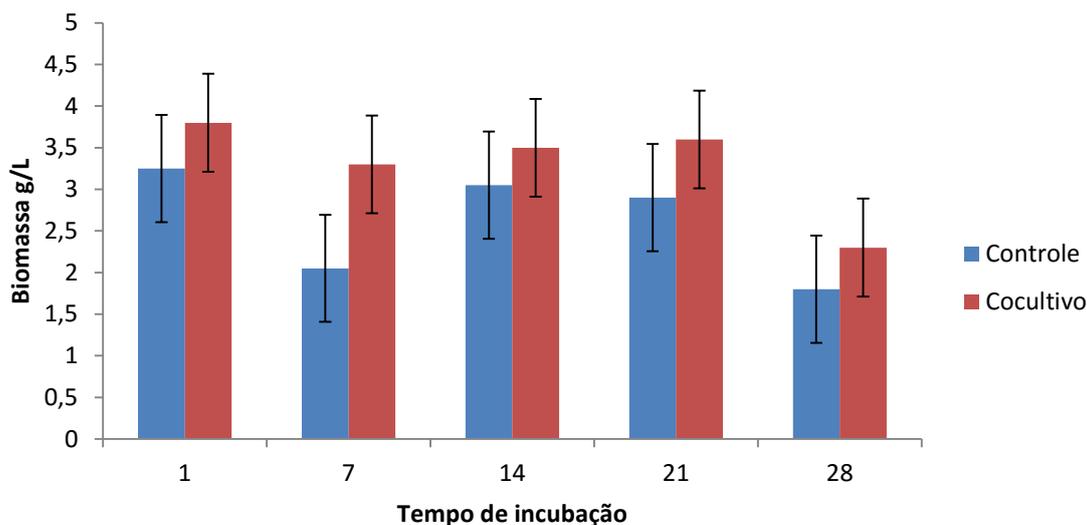


Figura 21: Produção de biomassa do controle e do cocultivo em diferentes tempos de incubação.

Em estudo realizado por Thakur et al. (2009) ao analisarem a influência nutricional na produção de metabólitos produzidos por *Streptomyces* sp., verificaram que a capacidade de formação de halos de inibição não está correlacionada com a produção de biomassa.

Segundo Antunes (2013) em uma avaliação de influência nutricional na otimização e produção de antimicrobianos por *Streptomyces* sp. não houve relação direta de produção de biomassa com a produção de extrato com ação antimicrobiana.

Da mesma forma, através do presente estudo pode-se sugerir que não houve uma correlação entre produção de biomassa e atividade antimicrobiana.

5.6 Avaliações do sobrenadante, do sobrenadante lisado e do sobrenadante semeado produzidos a partir do cocultivo, contra *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*

A partir do cocultivo, foi realizada avaliação do sobrenadante, do lisado e do sobrenadante semeado para verificar se os mesmos teriam atividade contra as bactérias *E. coli* e *P. aeruginosa*.

Os testes foram realizados conforme itens 4.11, 4.12, 4.13, porém não houve atividade antimicrobiana contra as bactérias multirresistentes em qualquer um dos testes. Sugere-se que isto tenha ocorrido pela ausência de condições nutricionais necessárias ao crescimento dos microrganismos.

5.7 Avaliação de extratos brutos com maior atividade antimicrobiana, contra cistos e trofozoítos de *A. polyphaga*

Após avaliação e seleção dos extratos brutos com melhor atividade antimicrobiana, realizou-se o teste para verificar se os mesmos extratos teriam ação contra cistos e trofozoítos de *A. polyphaga*. Após realização dos testes dos extratos conforme descrição no item 4.14, verificou-se que os extratos não apresentaram atividade contra *A. polyphaga*.

6 CONCLUSÕES

Através da interação entre *Acanthamoeba polyphaga* e *Streptomyces* sp. pelo modelo de cocultivo pode-se confirmar que as amebas inviabilizam após contato com *Streptomyces* sp. porém não foi significativo.

O cocultivo favoreceu o crescimento de *Streptomyces* sp., não alterando sua viabilidade, o que foi verificado pela emissão de hifas logo após 24 horas de contato até o tempo final de 672 horas, ao contrário do controle que permaneceu como esporo.

Cocultivos de *A. polyphaga* e *Streptomyces* sp em diferentes tempos de incubação produziram extratos brutos com ação antimicrobiana contra *E. coli* e *P. aeruginosa*.

Através de análise estatística foi possível confirmar diferença significativa no tempo de incubação de 24 horas, no qual os extratos apresentaram melhor atividade. *P. aeruginosa* foi o microrganismo mais sensível.

Quanto aos extratos brutos do cocultivo e controle apresentaram diferenças quanto à atividade antimicrobiana, porém não foram significativas.

Houve instabilidade na atividade antimicrobiana dos extratos produzidos a partir do cocultivo, como também pelo controle, o que pode ser atribuído à produção de diferentes compostos ao longo do tempo.

Quanto à produção de biomassa, tanto o controle como o cocultivo demonstraram aumento na produção de biomassas, porém esta foi maior para o cocultivo embora não tenha havido diferença estatística significativa. No entanto existiu diferença significativa de biomassas quando a comparação foi feita entre dias

e tempo de incubação.

Quando realizado cocultivo novamente para verificar se o mesmo teria ação contra *E. coli* e *P. aeruginosa* avaliando somente seu sobrenadante, lisado e sobrenadante semeado, os mesmos não demonstraram nenhuma atividade antimicrobiana.

Extratos selecionados com melhor atividade antimicrobiana, quando testados contra cistos e trofozoítos de *A. polyphaga* não mostraram atividade antiprotozoária contra os mesmos.

PERSPECTIVAS

Mais estudos serão necessários para identificar e caracterizar os compostos oriundos da interação entre *A. polyphaga* e *Streptomyces* sp.

Purificar os extratos brutos obtidos a partir da interação entre *Streptomyces* sp. e *A. polyphaga* por meio da técnica de cromatografia em coluna.

Realizar os mesmos experimentos com outras espécies de *Acanthamoeba*.

Identificar os compostos ativos por meio da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) e espectrometria de massas.

Identificar a estrutura molecular dos compostos ativos por meio da técnica de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio.

Avaliar a citotoxicidade dos compostos ativos sobre células VERO e HCE.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acharya N.R, Lietman TM & Margolis TP. 2007. Parasites on the rise: a new epidemic of *Acanthamoeba keratitis*. **American Journal of Ophthalmology** 144, 292-293.

Allen, S. D., & Janda, W. M. (2008). **Koneman diagnóstico microbiológico: texto y atlas en color**. Editorial Médica Panamericana.

Antunes, T. C., Salamoni, S. P., Frazzon, A. P. G., Germani, J. C., & Van Der Sand, S. T. Influência da fonte nutricional no crescimento ótimo e na produção de antimicrobianos produzidos por isolados de *Streptomyces* sp. **Revista Brasileira de Biociências**, 11(2), 2013.

Araujo, J. M. Estratégias para isolamento seletivo de actinomicetos. In: Melo, I. S.; Azevedo, J. L, ed. Ecologia Microbiana Jaguariúna: **Embrapa-CNPMA**, 1998. p. 351-367.

Awwad ST, Petroll WM, McCulley JP & Cavanagh HD. 2007. Updates in *Acanthamoeba keratitis*. **Eye and Contact Lens** 33, 1-8.

Baltz, R.H. Renaissance in antibacterial discovery from actinomycetes. **Current Opinion in Pharmacology**. v. 8, p. 557-563. 2008.

Barbeau, J., T. Buhler. 2001. Biofilms augment the number of free-living amoebae in dental unit waterlines. **Research Microbiology**. 152: 753 - 760.

Beck, J. M., Young, V. B., & Huffnagle, G. B. The microbiome of the lung. **Translational Research**, 160(4), 258-266.2012.

Berdy, J. Bioactive Microbial Metabolites. **The Journal of Antibiotics**, vol. 58 (1),

p. 1-26, 2005.

Bertrand, S., Bohni, N., Schnee, S., Schumpp, O., Gindro, K., & Wolfender, J. L. (2014). Metabolite induction via microorganism co-culture: a potential way to enhance chemical diversity for drug discovery. **Biotechnology advances**, 32(6), 1180-1204.

Bibb, M.J. Regulation of secondary metabolism in Streptomyces. **Current Opinion in Microbiology**, vol. 8, p. 208–215, 2005.

Booton, G. C.; Visvesvara, G. S.; Byres, T. J.; Kelly, D. J.; Fuerst, P. A.; Identification and Distribution of *Acanthamoeba* Species Genotypes Associated with Nonkeratitis Infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 1689–1693, 2005.

Bowers, B.; Korn, E. D. The fine structure of *Acanthamoeba castellanii* (Neff strain) II. Encystment. **The Journal of cell biology**, v. 41, n. 3, p. 786-805, 1969.

Caffrey, p.; Aparicio, j.f.; Malpartida, f. & Zotchev, S.B. Biosynthetic engineering of polyene macrolides towards generation of improved antifungal and antiparasitic agents. **Current Topics Medicinal Chemistry**. 8: 639 – 653, 2008.

Carlesso, A. M.; Artuso, G. L.; Caumo, K.; Rott, M. B. Potentially Pathogenic *Acanthamoeba* Isolated from a Hospital in Brazil. **Current Microbiology**, 2010.

Carlson, S., Tanouye, U., Omarsdottir, S., & Murphy, B. T. Phylum-specific regulation of resistomycin production in a Streptomyces sp. via microbial coculture. **Journal of natural products**, 78(3), 381-387, 2014.

Carvalho, T. D. S. Avaliação de atividade antibacteriana do actinomiceto endofítico R18 (6) contra bactérias gram-negativas multirresistentes, 2014.

Caumo, K.; Frasson A. P., Pens C. J., Panatieri L. F., Rott M. B.. Potentially pathogenic *Acanthamoeba* in swimming pools: a survey in the southern Brazilian city of Porto Alegre. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**. v. 103 (6): 477–

485, 2009.

Challis, G.L., Hopwood, D.A. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiples secondary metabolite production by *Streptomyces* species. **Protein Nucleotide Acids**, vol. 100, p. 14555-14561, 2003.

Charusanti, P., Fong, N. L., Nagarajan, H., Pereira, A. R., Li, H. J., Abate, E. A. & Palsson, B. O. Exploiting adaptive laboratory evolution of *Streptomyces clavuligerus* for antibiotic discovery and overproduction. **PLoS One**, 7(3), 2012.

Chomicz, L., Padzik, M., Graczyk, Z., Starosciak, B., Graczyk, T. K., Naprawska, A., Oledzka, G., Szostakowska, B. *Acanthamoeba castellanii*: In vitro effects of selected biological, physical and chemical factors. **Experimental Parasitology**, 2014.

Cichewicz, R. H. Epigenome manipulation as a pathway to new natural product scaffolds and their congeners. **Natural product reports**, 27(1), 11-22, 2010.

Da Rocha-Azevedo, B., Tanowitz, H., B., Marciano-Cabral, F., 2009. Diagnosis of infections caused by pathogenic free-living amoebae. **F. Interdisciplinary Perspectives Infectious Diseases**. 251406.

De Carli, A.G. Parasitologia Clínica, Seleção de Métodos e Técnicas de Laboratório para o Diagnóstico das Parasitoses Humanas. **Atheneu**. P. 422, 2001.

De Jonckheere, J. & Van de Voorde, H. (1976). Differences in destruction of cysts of pathogenic and nonpathogenic *Naegleria* and *Acanthamoeba* by chlorine. **Applied Environmental Microbiology** 31:294- 297.

De Lima Procópio, R. E., da Silva, I. R., Martins, M. K., de Azevedo, J. L., & de Araújo, J. M. (2012). Antibiotics produced by *Streptomyces*. **The Brazilian Journal of infectious diseases**, 16(5), 466-471.

Demain, A. L. Induction of microbial secondary metabolism. **International**

Microbiology, v. 1, p. 259-264, 1998.

De Oliveira, Margaroni Fialho. Identificação e caracterização de actinomicetos isolados de processo de compostagem. 2003. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

El-Tarabity, k.a. & Sivasithamparam, K. Non-streptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. **Soil Biology Biochemistry**, vol. 38(7), p. 1505-1520, 2006.

Ensign, J.C. Formation, properties, and germination of actinomycetes spores. **Annual review microbiology**, v.32, p.185-219, 1978.

Ertabaklar, H., Dayanir Apaydin, P., Ertug, S., Walochnik, J. 2009. Case report: *Acanthamoeba* keratitis. **Turkiye parasitology dergisi**. 33(4):283-5.

Ferreira, H.; Lala, E. R. P. *Pseudomonas aeruginosa*: Um alerta aos profissionais de saúde. **Revista Panamericana Infectologia**, v. 12, n. 2, p. 44-50, 2010.

Friedland, L. R., Raphael, S. A., Deutsch, E. S., Johal, J., Martin, L. J., Visvesvara, G. S., Lischner, H. W., 1992. Disseminated *Acanthamoeba* infection in a child with symptomatic human immunodeficiency virus infection. **The Pediatric Infectious Disease Journal's**. 11(5):404-7.

Geisen, S., Fiore-Donno, A. M., Walochnik, J., & Bonkowski, M. (2014). *Acanthamoeba* everywhere: high diversity of *Acanthamoeba* in soils. **Parasitology research**, 113, 3151-3158.

González, I.; Sacido, A.A.; Anderson, A.; Geniloud, O. Actinomycetes isolated from lichens: Evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequences. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 54, p. 401-415, 2005.

Graziani, E. I. Recent advances in the chemistry, biosynthesis and pharmacology of rapamycin analogs. **Natural product reports**, v. 26, n. 5, p. 602-609, 2009.

Greub G & Raoult D. 2004. Microorganisms resistant to free-living amoebae. **Clinical Microbiology Reviews** 17, 413-433.

Guimarães, D. O., Momesso, L. D. S., & Pupo, M. T. (2010). Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Quimica Nova**, 33(3), 667-679

Hamzaoui, A.; Salem, R.; Koubaac, M.; Zrig, M.; Mnif, H.; Abid, A.; Golli, M.; Mahjouba, S. *Escherichia coli* osteomyelitis of the ischium in an adult. **Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research**. v. 95, p. 636-638. 2009.

Holt, J.G.; Krieg, N.R.; Sneath, P.H.A.; Staley, J.T.; Williams, S.T. Facultatively anaerobic Gram-negative rods. In: **Bergey's Manual of determinative bacteriology**. 9 ed., Baltimore: Williams & Wilkins, 1994.

Hwang, K.; Kim, H.U.; Charusanti, P.; Palsson, B.; Lee S.Y. Systems biology and biotechnology of *Streptomyces* species for the production of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**. 2013.

ICMSF. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Microorganismos de los alimentos. **Su significado y métodos de enumeración**. 2. ed. Zaragoza: Editorial Acribia, 2000. p.147-150.

Insam, H. Developments in soil microbiology since the mid 1960s. **Geoderma regional** 100: 389 –402, 2001.

Iqbal, J., Siddiqui, R.; Khan, N.A. *Acanthamoeba* and bacteria produce antimicrobials to target their counterpart. **Parasites & vectors**, v. 7, n. 1, p. 1-6, 2014.

Jones, B.R.; Mc Gill, J.I.; Steele, A.D.M. 1975. Recurrent suppurative kerato-uveitis

with loss of eye due to infection by *Acanthamoeba castellani*. **Transactions of the American Ophthalmological Society**. 95: 210-13.

Khan, N. A., Siddiqui, R. Predator vs aliens: bacteria interactions with *Acanthamoeba*. **Parasitology**, v. 141, n. 07, p. 869-874, 2013.

Khan, N. A.; *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. Federation of European Microbiological Societies. **Microbiological Review**, v. 30, p. 564-595, 2006.

König, C. C., Scherlach, K., Schroeckh, V., Horn, F., Nietzsche, S., Brakhage, A. A., & Hertweck, C. (2013). Bacterium induces cryptic meroterpenoid pathway in the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. **ChemBioChem**, 14(8), 938-942.

Kurylowicz, W.; Antibióticos-Uma Revisão Crítica. Recife: Editora da Universidade Federal de Pernambuco. **Revista do Instituto de Antibióticos**, Recife, p. 341, 1981.

Kurylowicz, W.; Woznicka, W.; Paszkiewicz, A; Polowniak-Pracka, H.; Ultrastructure of actinomycetes and fungi during biosynthesis of antibiotics. **Revista do Instituto de Antibióticos**, Recife, vol.19 n. (1/2), 1979.

Kwaik, Y. Abu. The phagosome containing *Legionella pneumophila* within the protozoan *Hartmannella vermiformis* is surrounded by the rough endoplasmic reticulum. **Applied and environmental microbiology**, v. 62, n. 6, p. 2022-2028, 1996.

Lacaz, C. S.; Porto, E. ; Martins, J. E. C. ; Heins-vaccari, E. M. ; Melo, N. T. Tratado de Micologia Médica. 9. ed. São Paulo: **Sarvier Editora de Livros Médicos**, 2002.

Lamrabet, O., Medie, F. M., Drancourt, M. *Acanthamoeba polyphaga*-enhanced growth of *Mycobacterium smegmatis*. **Reviews plos one**, 2012.

Lancini, G. & Lorenzetti, R. (e.d.s.) Biotechnology of antibiotic and other bioactive

microbial metabolic. **Plenum press**. p. 29-33, 1993.

Landell M F ; Salton J ; Caumo, K. ; Broetto, L. ; Rott, M. B. . Isolation and genotyping of free-living environmental isolates of *Acanthamoeba* spp. from bromeliads. **Experimental Parasitology**, v. 1, p. 1, 2013.

Leblond, P.; Decaris, B. New insights into the genetic instability of *Streptomyces*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 123, p. 223-232, 1994.

Livermore, D.M. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? **Antimicrobial Resistance**. v. 34, p. 634-640. 2002.

McGregor, J. F. (1954). Nuclear Division and the Life Cycle in a *Streptomyces* sp. **Journal of general microbiology**, 11(1), 52-56.

Madigan, M.T.; Martinko, J.M.; Parker, J. **Microbiologia de Brock**. 10ª Edição. São Paulo: Prentice Hall, 2004. 608 p.

Marciano-Cabral, F.; Cabral, G.; *Acanthamoeba* spp. as Agents of Disease in Humans. *Clinical Microbiology Reviews* - **American Society for Microbiology**. v. 16, p. 273–307, 2003.

Maschio, V. J. ; Carlesso, A. M. ; Chies, F. ; Carvalho, A. ; Santos, S. P. R. ; Sand, S. V. D. ; Rott, M. B. . *Acanthamoeba*_ T4, T5 and T11 isolated from mineral water bottles in southern Brazil. **Current Microbiology**. v. 1, p. 1-5, 2014.

Medina, G., Flores-Martin, S., Fonseca, B., Otth, C., & Fernandez, H. (2014). Mechanisms associated with phagocytosis of *Arcobacter butzleri* by *Acanthamoeba castellanii*. **Parasitology research**, 113(5), 1933-1942.

Mesaros N., Nordmann P., Plésiat P., Roussel-delvallez M., J. van Eldere, Glupczynski Y., van Laethem Y., Jacobs F., Lebecque P., Malfroot A. **Clinical Microbiology infections**, 2007.

Molmeret, M., Horn, M., Wagner, M., Santic, M. and Kwaik, Y. A. Amoebae as training grounds for intracellular bacterial pathogens. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 1, p. 20-28, 2005.

Nieder Korn, J.Y., H. Alizadeh, H. Leher, J.P. McCulley. 1999. The immunobiology of *Acanthamoeba keratitis*. **Springer seminars immunopathology**. V.21, p.147-160.

Okami, Y.; Hotta, K. Search and discovery of new antibiotics. In: Goodfellow, M.; Williams, S. T.; Mordanski, M. **Actinomycetes in Biotechnology**. New York: Academic, 1988.

Ollano, C.; Mendez, C.M. & Salas, J.A. Antitumor compounds from actinomycetes: from gene clusters to new derivatives by combinatorial biosynthesis. **Natural product reports**. 26: 628 – 660, 2009.

Padilha, G. Biologia molecular de *Streptomyces* e aplicações industriais. In: Melo, I. S. e Azevedo, J.L. **Ecologia microbiana. Jaguariúna: Embrapa**, 1998. p.327-347.

Pens, C.J ; Costa, M; Fadanelli, C; Caumo, K; Rott, M. B. *Acanthamoeba* spp. and bacterial contamination in contact lens storage cases and the relationship to user profiles. **Parasitology Research**, v. 103, p. 1241-1245, 2008.

Perez MT & Bush LM. *Balamuthia mandrillaris* amebic encephalitis. **Current Infectious Disease Reports** 9, 323-328, 2007.

Phaff, H, J. Industrial microorganism. **Scientific american**, v.245, n.3, p.77-89, 1981.

Pitout, J. D. D. Multiresistant Enterobacteriaceae: new threat of an old problem. **Expert Reviews**, v. 6, n. 5, p. 657–669, 2008.

Raju, A.; Piggott, A. M.; Conte, M.; Tnimov, Z.; Alexandrov, K.; Capon, R. J. Nocardiopsins: New FKBP12-Binding Macrolide Polyketides from an Australian Marine-Derived Actinomycete, *Nocardiopsis* sp. **Chemistry European Journal**. Vol.

16, p.3194 – 3200, 2010.

Rath, S.; Dubey, D.; Sahu, M.C.; Debata, N.K.; Padhy, R.N Surveillance of ESBL producing multidrug resistant *Escherichia coli* in a teaching hospital in India. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**. v. 4, n. 2, p. 140-149. 2014.

Reyes-Batlle, M., Todd, C. D., Martín-Navarro, C. M., López-Arencibia, A., Cabello-Vilchez, A. M., González, A. C, & Lorenzo-Morales, J. Isolation and characterization of *Acanthamoeba* strains from soil samples in Gran Canaria, Canary Islands, Spain. **Parasitology research**, 113(4), 1383-1388, 2014.

Rodriguez-Zaragoza S. 1994. Ecology of free-living amoebae. **Critical Reviews of Microbiology** 20, 225-241.

Rønn, R., McCaig, A. E., Griffiths, B. S. and Prosser, J. I. Impact of protozoan grazing on bacterial community structure in soil microcosms. **Applied and Environmental Microbiology** 68, 6094–6105, 2002.

Ross-Davis, A. L., Stewart, J. E., Shaw, J. D., Kim, M. S., & Klopfenstein, N. B. Metagenomic approaches for surveying forest soil microbial communities on permanent plots. **Phytopathology**, 103, 123, 2013.

Salamoni, S. P., Van Der Sand, S. T., Germani, J. C. Estudo de Produção de Compostos com Atividade Antimicrobiana produzidos por *Streptomyces* sp. 1S. **Evidência-Ciência e Biotecnologia**, v. 12, n. 2, p. 175-186, 2012.

Sandland, G. J., Rodgers, J. K., & Minchella, D. J. Interspecific antagonism and virulence in hosts exposed to two parasite species. **Journal of invertebrate pathology**, 96(1), 43-47, 2007

Sarparanta, K., Lindbohm, N., Tervo, T., Tuisku, I., Jokiranta. S. *Acanthamoeba keratitis*. **Duodecim Medical**. 125(15):1639-46, 2009.

Sharma, G.; Rao, S.; Bansal, A.; Dang, S.; Gupta, S.; Gabrani, R. *Pseudomonas*

aeruginosa biofilm: potential therapeutic targets. **Biologicals**. v. 42, p. 1-7. 2014.

Siddiqui, R.; Khan, N.A. War of the microbial worlds: Who is the beneficiary in *Acanthamoeba*–bacterial interactions?. **Experimental parasitology**, v. 130, n. 4, p. 311-313, 2012.

Steenbergen, J. N., Nosanchuk, J. D., Malliaris, S. D., & Casadevall, A. (2004). Interaction of *Blastomyces dermatitidis*, *Sporothrix schenckii*, and *Histoplasma capsulatum* with *Acanthamoeba castellanii*. **Infection and immunity**, 72(6), 3478-3488.

Taechowisan, T.; Peberdy, J.F.; Lumyong, S. Isolation of endophytic actinomycetes from selected plants and their antifungal activity. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. v.19, p. 381–385, 2003.

Tanvir, R.; Sajid, I.; Hasnain S. Screening of endophytic streptomycetes isolated from *Parthenlum hysterophorus* L. against nosocomial pathogens. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Science**. v. 26, n. 2, p. 277-283. 2013.

Thakur, D., Bora, T. C., Bordoloi, G. N., & Mazumdar, S. Influence of nutrition and culturing conditions for optimum growth and antimicrobial metabolite production by *Streptomyces* sp. 201. **Journal de Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology**, 19(3), 161-167, 2009.

Torno, M.S., JR., R. Babapour, A. Gurevitch, M. D. Witt. 2000. Cutaneous acanthamoebiasis in AIDS. **J. American Academy of Dermatology**. 42: 351-354.

Tosetti, N., Croxatto, A., Greub, G. Amoebae as a tool to isolate new bacterial species, to discover new virulence factors and to study the host–pathogen interactions. **Microbial pathogenesis**, v. 77, p. 125-130, 2014.

Turner, N.A.; Harris, A.D.; Lloyd, D. Observation microbial differentiation and changes in susceptibility to antimicrobial agents. **J. Applied and Environmental Microbiology** 89(5): 751, 2000.

Vaishnav, P.; Demain, A.L. Unexpected applications of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**. v. 29, p. 223-229. 2010.

Ventura, M.; Canchaya, C.; Chandra, G.; Fitzgerald, G. F.; Chater, K. F.; Sinderen, D. Genomics of actinobacteria: tracing the evolutionary History of an Ancient Phylum. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 71, n, 3, p. 495–548, 2007.

Visvesvara, G. S., Moura, H., Schuster, F. L., 2007. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. **FEMS Medical microbiology immunology**. 50(1):1-26.

Vobis, G. Morphology of actinomycetes. **Atlas of Actinomycetes**, p. 180-191, 1997.

Wang, Y.; Feng, X.; Jiang, L. Current advances in diagnostic methods of *Acanthamoeba* keratitis. **Chinese medical journal**, v. 127, n. 17, p. 3165-3170, 2014.

Whiteley, M.; Banger, M.G.; Bumgarner, R.E.; Parsek, M.R.; Teitzel, G.M.; Lory, S.; Greenberg, E. P. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Nature**. v. 413, p. 860-864, 2001.

Yli-Pirilä, T., Kusnetsov, J., Hirvonen, M. R., Seuri, M., & Nevalainen, A. (2006). Effects of amoebae on the growth of microbes isolated from moisture-damaged buildings. **Canadian Journal of Microbiology**, 52(4), 383-390.

Yousuf, F. A., Siddiqui, R.; Khan, N.A. *Acanthamoeba castellanii* of the T4 genotype is a potential environmental host for *Enterobacter aerogenes* and *Aeromonas hydrophila*. **Parasitology Vectors**, v. 6, p. 169, 2013.

ANEXOS

ANEXO A: Preparo de meios de cultivo e soluções utilizadas

Meio Protease Peptona – Extrato de Levedo – Glicose (PYG)

- 7,5g de proteose peptona
- 0,75g de extrato de levedo
- 0,98g de sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
- 0,059g de cloreto de cálcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- 1g de citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- 0,02g de sulfato ferroso amoniacal [$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$]
- 0,034g de diidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4)
- 0,355g de hidrogenofosfato dissódico anidro (NaH_2PO_4)
- 15g de glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)
- Água destilada q.s.p 1000 mL

Preparo: Todos os componentes foram dissolvidos na ordem apresentada, com exceção do CaCl_2 que foi dissolvido separadamente e adicionado após o resfriamento da solução. O pH foi ajustado em $6,5 \pm 0,2$ e a solução esterilizada por autoclavagem a 121°C por 15 min. De Carli (2001).

Tampão fosfato salino (PBS) 10 X concentrado

- 85,0g de cloreto de sódio (NaCl)

- 15,5g de fosfato de sódio dibásico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- 2,3g de dihidrogenofosfato de sódio ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)
- Água deionizada q.s.p. 1000ml

Preparo: Todos os componentes foram dissolvidos juntos. O pH foi ajustado em $7,2 \pm 0,2$ e a solução esterilizada por autoclavagem (121°C por 15 min).

Para o preparo da solução tampão fosfato de sódio 1x, 1 parte da solução de PBS 10x foi diluída em 9 partes de água destilada deionizada. A solução foi esterilizada por autoclavagem 121°C por 15 min, De Carli, (2001).

Meio Amido Caseína – (ACA)

- 10g amido / substituído por de glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) melhor crescimento.
- 0,30g Caseína
- 0,05g de sulfato de magnésio (MgSO_4)
- 2g de cloreto de sódio (NaCl_2)
- 2g Nitrato de potácio (KNO_3)
- 2g de sulfato ferroso amoniacal (FeSO_4)
- 0,034g Fosfato potássio dibásico (K_2HPO_4)
- 0,02g Carbonato de cálcio (CaCO_3)
- 15g ágar bacteriológico
- Água destilada 1000 mL

Preparo: Todos os componentes foram dissolvidos. O pH foi ajustado em $6,5 \pm 0,2$ e a solução esterilizada por autoclavagem (121°C por 15 min).

Caldo Amido caseína

- 10g amido / substituído por de glicose ($C_6H_{12}O_6$) melhor crescimento.
- 0,30g Caseína
- 0,05g de sulfato de magnésio ($MgSO_4$)
- 2g de cloreto de sódio ($NaCl_2$)
- 2g Nitrato de potácio (KNO_3)
- 2g de sulfato ferroso amoniacal ($FeSO_4$)
- 0,034g Fosfato potássio dibásico (K_2HPO_4)
- 0,02g Carbonato de cálcio ($CaCO_3$)
- Água destilada 1000 mL

Preparo: Todos os componentes foram dissolvidos. O pH foi ajustado em $6,5 \pm 0,2$ e a solução esterilizada por autoclavagem ($121\text{ }^\circ\text{C}$ por 15 min).